

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Mise en Evidence d'une Forme Soluble de la Chaîne
Alpha du Récepteur de l'Interleukine-15 Humaine :
Caractérisation Structurale et Fonctionnelle**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue par

Erwan MORTIER

Le 21 Octobre 2005, devant le jury ci-dessous

Président :

François LANG

Professeur des Universités, Nantes

Rapporteurs :

Bruno AZZARONE

Directeur de Recherche, Villejuif

Hervé WATIER

Professeur des Universités-PH, Tours

Examineurs :

Hugues GASCAN

Directeur de Recherche, Angers

Ariane PLET

Chargée de Recherche, Nantes

Directeur de thèse :

Yannick JACQUES

Directeur de Recherche, Nantes

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
RESUMÉ	11
ABSTRACT	12
INTRODUCTION	13
LES CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS	14
I. Généralités.	14
A. Les cytokines.	14
B. Les récepteurs de cytokines.	16
II. Les cytokines hématopoïétiques.	19
A. Caractéristiques des cytokines hématopoïétiques.	19
B. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques.	19
1. Structure des chaînes réceptrices.	19
2. Les familles de récepteurs hématopoïétiques.	20
C. La transduction du signal des cytokines hématopoïétiques.	22
LE SYSTEME IL-15	23
I. L'Interleukine-15.	23
A. Caractéristiques moléculaires et biochimiques de l'IL-15 humaine.	23
1. Caractéristiques du gène et des messagers de l'IL-15.	23
2. Caractéristiques protéiques de l'IL-15.	26
a) Forme soluble.	26
b) Forme membranaire.	26
B. Sites d'expression de l'IL-15.	27
C. Régulation de l'expression de l'IL-15.	28
1. Régulation transcriptionnelle de l'expression de l'IL-15.	28
2. Régulation traductionnelle de l'expression de l'IL-15.	29
3. Régulation post-traductionnelle de l'expression de l'IL-15.	30
II. Les Récepteurs de l'IL-15.	31
A. Le récepteur de l'IL-15 commun au récepteur de l'IL-2.	32
1. La chaîne γ_c réceptrice.	32
2. La chaîne IL-2/15R β (CD122).	34
B. La chaîne privée du récepteur de l'IL-15 : l'IL-15R α .	36
1. Identification et clonage de la chaîne IL-15R α .	36
2. Caractéristiques du gène et des messagers de l'IL-15R α .	36
3. Caractéristiques protéiques de l'IL-15R α .	37
4. Sites d'expression de l'IL-15R α .	40
5. Régulation de l'expression de l'IL-15R α .	40

6.	La chaîne réceptrice IL-15RX des mastocytes.	41
C.	La transduction du signal IL-15.	41
1.	Signalisation par le récepteur dimérique IL-2R β / γ_c et le récepteur trimérique IL-15R α / IL-2R β / γ_c .	41
a)	Les kinases JAK1 et JAK3.	41
b)	Les facteurs STAT3 et STAT5.	42
c)	Les MAPKs ERK1, JNK et p38 MAPK.	42
d)	La PI3-K.	42
2.	Signalisation par l'IL-15R α .	43
3.	Signalisation dans les mastocytes.	43
4.	Signalisation par le récepteur hybride IL-15R α /IL-2R β / β_c des cellules TF-1 β .	44
5.	Signalisation par le récepteur IL-15R α des cellules TF-1 et TF-1 β .	44
III.	Les Fonctions Biologiques de l'IL-15.	46
A.	Les fonctions biologiques de l'IL-15 dans le système immunitaire.	46
1.	Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques.	46
2.	Les lymphocytes T.	47
a)	Les lymphocytes T à TCR $\alpha\beta$.	47
(1)	L'homéostasie des lymphocytes T.	47
(2)	La prolifération de lymphocytes T.	47
(3)	La survie des lymphocytes T.	48
(4)	La migration des lymphocytes T.	48
(5)	L'activation des lymphocytes T.	48
(6)	La sécrétion de cytokines par les lymphocytes T.	48
b)	Les IELs.	49
c)	Les lymphocytes T à TCR $\gamma\delta$.	49
d)	Les cellules NK-T.	50
3.	Les lymphocytes B.	50
4.	Les cellules NK.	50
a)	Le développement des cellules NK.	51
b)	La migration de cellules NK.	51
c)	L'activation des cellules NK.	51
d)	La prolifération des cellules NK.	51
e)	La sécrétion de cytokines par les cellules NK.	51
5.	Les éosinophiles.	52
6.	Les neutrophiles.	52
7.	Les mastocytes.	52
B.	Les fonctions biologiques de l'IL-15 en dehors du système immunitaire.	53
IV.	Les fonctions de l'IL-15 dans un contexte pathologique.	55
A.	Les infections virales.	55
1.	Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : VIH.	55
2.	Autres virus.	56
B.	Les maladies inflammatoires.	56
1.	La polyarthrite rhumatoïde.	56
2.	Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.	57
3.	Les autres pathologies inflammatoires.	58
C.	Le rejet de greffe.	58
D.	Les cancers.	59
(1)	La leucémie lymphocytaire T de l'adulte.	59
(2)	La paraparésie spastique tropicale.	59
(3)	Les lymphomes cutanés T épidermotropes.	59
(4)	La leucémie à grands lymphocytes à grains.	60
(5)	Les leucémies lymphocytaires B et les myélomes.	60
(6)	Les mélanomes.	60
(7)	Les autres tumeurs solides.	61

E. Les infections microbiennes.	61
V. L'IL-15 en thérapie.	63
LES RECEPTEURS SOLUBLES DE CYTOKINES	65
I. Mode de production des récepteurs solubles.	65
A. Mécanismes de génération d'un récepteur soluble.	65
1. Coupure protéolytique	65
2. Transcription des ectodomaines des récepteurs solubles de cytokines.	68
a) Synthèse à partir d'un épissage alternatif de l'ARN messager	68
b) Transcription de gènes distincts codant pour des protéines solubles liant les cytokines.	69
3. Mécanisme de relargage de récepteurs de cytokine par l'intermédiaire des vésicules exosome-like.	69
4. Génération des récepteurs solubles de cytokines par relargage d'ectodomaines lié par une ancre GPI.	70
5. Les récepteurs solubles de cytokines issus de virus.	70
B. Régulation de la production du récepteur soluble.	71
1. Activation cellulaire.	71
2. Cytokines.	72
3. Autres facteurs.	74
II. Fonctions immunorégulatrices des récepteurs solubles de cytokines.	74
A. Effets antagonistes.	74
(1) L'effet antagoniste est cytokine-spécifique.	75
(2) L'effet antagoniste est inversement lié à la concentration de cytokine.	75
(3) L'effet antagoniste est influencé par les affinités de liaison de la cytokine pour ses récepteurs soluble et membranaire.	75
B. Rôle de transporteur ("carrier") et effet agoniste.	78
(1) Accroître la stabilité de la cytokine.	78
(2) Protection contre la protéolyse.	78
(3) Transfert de la cytokine de son récepteur soluble vers son récepteur membranaire.	78
(4) Augmentation de la 1/2 vie et diminution de la clairance.	79
(5) Sensibilisation.	79
III. Les propriétés des récepteurs solubles et leurs implications dans les pathologies: cas du sIL-2Rα.	81
IV. Les formes solubles de complexes cytokine / récepteur.	83
A. Le système IL-6.	83
1. α .	83
2. T anssignalisation.	85
3. l' Hyper-IL-6.	86
4. Autres complexes cytokine/récepteur de la famille IL-6.	88
B. La famille IL-12.	88
1. Caractéristiques.	88
2. Les effets biologiques de l'IL-12.	88
3. Structure du récepteur de l'IL-12.	89
4. L'IL-23 et l'IL-27.	89
V. Les récepteurs solubles de cytokines en thérapie.	92
A. Récepteurs solubles comme agents thérapeutiques.	92
1. Avantages.	92
2. Inconvénients.	93
B. Utilisation clinique et applications.	93

a) Maladies inflammatoires. _____	93
b) Asthmes et allergies. _____	94
c) Régulations immunitaires. _____	94
d) Facteurs de croissance autocrine pour les cellules tumorales. _____	94
C. Observations cliniques. _____	94
RÉSULTATS _____	96
AVANT PROPOS _____	97
I. Mise en évidence d'une forme soluble de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-15. 98	
A. Résumé. _____	98
B. Introduction. _____	99
C. Résultats. _____	99
D. Article I. _____	103
II. Effet agoniste du IL-15Rα-sushi soluble en présence d'IL-15 sur les cellules exprimant IL-2Rβ et γ. _____	112
A. Résumé. _____	112
B. Introduction. _____	113
C. Résultats. _____	114
D. Article II. _____	118
III. IL-15, sIL-15Rα, complexe IL-15/sIL-15Rα et pathologies. _____	127
A. Introduction. _____	127
B. Mise en évidence d'un complexe IL-15/sIL-15R α dans le surnageant de COS-7 double transfectées. _____	127
1. Méthodes de détection du sIL-15R α , de l'IL-15 et du complexe. _____	127
2. Détection d'un complexe IL-15/sIL-15R α dans les surnageants de COS-7 exprimant l'IL-15 et l'IL-15R α membranaire. _____	129
C. Mise en Evidance du sIL-15R α et d'IL-15 dans les sérums de patients atteints de Maladie de Crohn. _____	130
DISCUSSION _____	133
CONCLUSION ET PERPECTIVES _____	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	146
ANNEXES _____	173

LISTE DES ABRÉVIATIONS

β_c : chaîne β commune
 γ_c : chaîne γ commune
 Δ : délétion
aa : acide aminé
Ac : Anticorps
Act : Activines
ADAM : "A Desintegrin And Metalloprotease"
ADCC : "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity"
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AICD : "Activation-Induced Cell Death"
Akt : "cellular homolog of the v-akt oncogene" ou PKB, isolée à partir de la lignée murine AKR issue de Thymome
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATL : "Adulte T cell Leukemia"
Bad : "Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter"
BCG : Bacille de Calmette-Guérin
Bcl-xL : "B cell leukaemia x Large form protein"
BP : "Binding Protein"
BSA : "Bovine Serum Albumin"
Caspases : "Cysteine proteases with aspartate specificity"
CBM : "Cytokine Binding Module"
CD : "Cluster of Differentiation"
CLC : "Cardiotrophin-Like Cytokine"
CLF-1 : "Cardiotrophin-Like Factor-1"
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNTF : "Ciliary Neurotrophic Factor"
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
cpm : coup par minute
CRH : "Cytokine Receptor Homology domain"
Crm : Cytokine response modifying
CSF : "Colony Stimulating Factor"
CT-1 : "Cardiotrophin-1"
CTL : "Cytolytic T Lymphocytes"
DcR : "Decoy Receptor"
DETC : "Dendritic Epidermal T Cell"
DMEM : "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO : diméthylsulfoxyde
DR : "Death Receptor"
EBI-3 : "Epstein-Barr virus-induced gene 3"
EBV : "Epstein-Barr Virus"
EC₅₀ : "Effective Concentration 50%"
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF : "Epidermal Growth Factor"
ELISA : "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
EPO : Erythropoïétine
ERK : "Extracellular signal-Regulated Kinase"
FADD : "FAS-Associated Death Domain protein"
FGF : "Fibroblast Growth Factor"
FITC : Fluoresceine IsoThioCyanate
Flt-3L : "Fms-like tyrosine kinase 3"

FNIII : "Fibronectine III"
FT : facteur de transcription
Gab2 : "Grb associated binder 2" ou p98
G-CSF : "Granulocyte-Colony Stimulating Factor"
GF : "Growth Factor"
GFP : "Green Fluorescent Protein"
GH : "Growth Hormone" ou Somatotropine
GM-CSF : "Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor"
gp : glycoprotéine
GP-1 : "Glycoprotein-1"
GPI : glycosyl-phosphatidylinositol
Grb-2 : "Growth factor receptor-bound protein 2"
GVHD : "Graft vs. Host Diseases"
GVL : "Graft vs. Leukemia"
h : humain
HAART : "Highly Active Antiretroviral Therapy"
HAM : "HTLV-1-Associated Myelopathy" ou TSP
HHV : "Human Herpes Virus"
HLA : "Human Leucocyte Antigen"
HSV : "Herpes Simplex Virus"
HTLV-1 : "Human T cell Leukemia Virus-1"
HUVEC : "Human Umbilical Vein Endothelial Cells"
I κ B : "Inhibitor of NF- κ B"
IC₅₀ : "Inhibitory Concentration 50%"
ICAM : "Intercellular Adhesion Molecule"
IEL : "Intraepithelial Lymphocyte"
IFN : Interféron
Ig : "Immunoglobuline"
IKK : "I-Kappa-B Kinase"
IL- : Interleukine-
IL-1ra : "IL-1 receptor antagonist"
IL-1RAcP : "Interleukin-1 Receptor Accessory Protein"
ILR : Protéine de fusion IL-15/sIL-15R α -sushi
Inh : Inhibines
IRF-E : "Interferon Regulatory Factor response Element"
JAK : "Janus-Associated Kinase"
JNK : "c-Jun N-terminal Kinase" ou SAPK
ka : constante cinétique d'association
kb : kilobases
kd : constante cinétique de dissociation
KIR : "Killer cell Immunoglobulin-like Receptor"
KLR : "Killer Lectin-like Receptor"
KO : Knock Out
KSV-IL-6 : "Kaposi Sarcoma associated human herpes Virus 8 interleukin-6"
L : Ligand
LAK : "Lymphokine-Activated Killer" ou "Lymphokine-Activated Killing"
LCTE : Lymphomes Cutanés T Epidermotropes
LGL : "Large Granular Lymphocytes"
LGLLD : "Large Granular Lymphocytes Lymphoproliferative Disorder"
LFA : "Leukocyte Function-associated Antigen"
LIF : "Leukemia Inhibitory Factor"
LIGHT : "homologous to Lymphotoxins, exhibits Inducible expression, competes with HSV Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes"

LPS : lipopolysaccharide
LSP : "Long Peptide Signal"
LT : Lymphotoxine
LTR : "Long Terminal Repeat"
LZ : "Leucine Zipper"
m : murine
MAPK : "Mitogen-Activated Protein Kinases"
MC : Maladie de Crohn
Mcl-1 : "Myeloid cell leukemia sequence 1"
MCP : "Monocyte Chemoattractant Protein"
M-CSF : "Macrophage-Colony Stimulating Factor"
MF : Mycosis Fongoïde
MIP : "Macrophage Inflammatory Protein"
MMP : Matrix Metalloprotease
MT-MMP : "Membrane-Type MMP"
NES : "Nuclear Export Sequence"
NF- κ B : "Nuclear Factor kappa B"
NGF : "Nerve Growth Factor"
NIK : "NF-kappa-B-inducing kinase"
NK : "Natural Killer" ou "Natural Killing"
NKR : "Natural Killer Receptor"
NK-T : "Natural Killer T cell" ou NK1+T
NLS : "Nuclear Localisation Sequence"
nt : nucléotide
OSM : Oncostatine M
p : protéine
P-Tyr : Phosphotyrosine
p70^{S6K} : "small subunit ribosomal protein S6 Kinase"
PBMC : "Peripheral Blood Mononuclear Cells"
PBS : "Phosphate Buffered Saline"
PCR : "Polymerase Chain Reaction"
PDGF : "Platelet-Derived Growth Factor"
PK1 : "3-Phosphatidyl inositol-Dependent protein Kinase 1"
PE : Phycoerythrine
PEG : Polyéthylène Glycol
PI3-K : "Phosphatidyl Inositol 3-Kinase"
PKB : "Protein Kinase B" ou Akt, isolée à partir de la lignée murine AKR issue de Thymome
PKC : "Protein Kinase C"
PLC : Phospholipase C
PMA : "Phorbol-Myristate Acetate"
PP2A : "Protein Phosphatase 2A"
PPL : Préprolactine
PRL : Prolactine
Pyk2 : "Proline-rich tyrosine kinase 2"
R : récepteur
r : recombinant
RANKL : "Ligand of Receptor Activator of NF- κ B"
RANTES : "Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted"
RAS : radioactivité spécifique
RCH : Rectocolite Hémorragique
RIA : "Radio-Immuno Assay"
RIP : "Receptor Interacting Protein"
RLI : Protéine de fusion sIL-15R α -sushi/IL-15

Rm-IL-6 : "Rhesus macaque rhadinovirus Interleukin-6"
RMPI : "Roosevelt Park Memorial Institute Medium"
RU : unité de résonance plasmonique de surface
s : soluble
SBE : "STAT-Binding Element"
SCF : "Stem Cell Factor"
SDF : "Stromal cell-Derived Factor"
SH2 : "Src-Homology 2"
SH3 : "Src-Homology 3"
Shc : "SH2-containing collagen-related protein"
sIL-15R α : Forme soluble de la chaîne α de l'IL-15R
sIL-15R α -sushi : Forme soluble du domaine sushi de l'IL-15R α
Sos : "Son of sevenless"
SRC : "Short Consensus Repeat"
SS : Syndrome de Sézary
SSP : "Short Signal Peptide"
STAT : "Signal Transducer and Activator of Transcription"
SVF : Sérum de Veau Fœtal
Syk : "Spleen tyrosine kinase"
TACE : "TNF α Converting Enzyme"
TCA : acide trichloracétique
TCR : "T Cell Receptor"
TGF : "Transforming Growth Factor"
TIL : "Tumor Infiltrating Lymphocytes"
TLA-1 : "endothelial cell-derived TNF-like factor"
TNF : "Tumor Necrosis Factor"
TNFRSF : "TNF Receptor Superfamily"
TPO : Thrombopoïétine
TRADD : "TNF-R1-Associated Death Domain protein"
TRAF2 : "TNF-R Associated Factor 2"
TRAIL : "TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand"
TSLP : "Thymic Stromal Lymphopoietin"
TSP : "Tropical Spastic Paraparesis" ou HAM
UV : Ultraviolets
VCAM : "Vascular Cell Adhesion Molecule"
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
WT : "Wild Type"
X-SCID : "X-linked severe combined immunodeficiency"

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES :

Figure 1 : Groupes ou Familles de Cytokines. _____	15
Figure 2 : Familles de Chaînes Réceptrices Membranaires des Cytokines. _____	18
Figure 3 : Gène, Transcription, Traduction et Maturation Protéique de l'IL-15 Humaine. ____	25
Figure 4 : Récepteurs Fonctionnels des Cytokines Hématopoïétiques et Transprésentation. _____	35
Figure 5 : Gène, Transcription et Traduction de la Chaîne IL-15R α . _____	39
Figure 6 : Récepteurs Fonctionnels de l'IL-15. _____	45
Figure 7 : Fonctions Physiologiques de l'IL-15 dans le Système Immunitaire. _____	54
Figure 8 : IL-15 et Pathologies. _____	62
Figure 9 : Les Deux Principaux Modes de Génération des Récepteurs Solubles. _____	67
Figure 10 : Fonctions Immunorégulatrices des Récepteurs Solubles de Cytokines. _____	77
Figure 11 : Transsignalisation et Hyper-Cytokines. _____	87
Figure 12 : Récepteurs Multimériques Fonctionnels des Cytokines de la Famille IL-6 / IL-12. _____	91
Figure 13 : Schéma Récapitulatif de la Mise en Evidence du sIL-15R α . _____	102
Figure 14 : Schéma Récapitulatif de l'Effet Agoniste du sIL-15R α -sushi et des Protéines de Fusion IL-15 / sIL-15R α -sushi. _____	117
Figure 15 : Les Différents RIAs de Détection du sIL-15R α , de l'IL-15 et du Complexe. ____	128
Figure 16: Dosages du sIL-15R α et de l'IL-15 chez 11 Patients Atteints de la Maladie de Crohn avant Traitement et après 6 Semaines de Traitement anti-TNF α (Rémicade®). 131	

TABLEAUX :

Tableau 1 : Les Différents Récepteurs Solubles de Cytokines, leurs Modes de Production et leurs Actions. _____	80
Tableau 2 : Récepteurs Solubles et leurs Applications. _____	95
Tableau 3 : Expression de l'IL-15 et de la Chaîne IL-15R α à la Surface, à l'Intérieur et dans les Surnageants de Culture des Cellules COS Transfectées. _____	129

RESUMÉ

Mise en Evidence d'une Forme Soluble de la Chaîne Alpha du Récepteur de l'Interleukine-15 Humaine: Caractérisation Structurale et Fonctionnelle.

L'Interleukine-15 (IL-15) est une cytokine qui présente des activités semblables à celles de l'IL-2 *in vitro* du fait de l'utilisation commune des chaînes réceptrices IL-2R β et γ_c , la spécificité d'action étant conférée par une chaîne réceptrice α . L'IL-2R α existe sous forme soluble après clivage protéolytique de la forme membranaire. Dans cette étude, nous avons mis en évidence *in vitro* puis *in vivo* une forme soluble de la chaîne IL-15R α , issue du clivage de l'IL-15R α membranaire et possédant une forte activité antagoniste de l'action de l'IL-15. Le domaine N-terminal de l'IL-15R α (sIL-15R α -sushi) en combinaison avec l'IL-15, s'avère être, quant à lui, agoniste pour les cellules n'exprimant que les chaînes IL-2R β et γ_c , effet renforcé par la liaison IL-15/sIL-15R α grâce à un linker. Ce travail montre que le sIL-15R α est une composante importante dans la régulation des activités de l'IL-15 et pourrait conduire à différentes applications thérapeutiques.

ABSTRACT

Molecular and Functionnal Characterisation of a Natural Human Soluble Form of the Interleukin-15 Receptor Alpha Chain.

Interleukin-15 (IL-15) mimics most of the *in vitro* biological activity elicited by IL-2. This redundancy is explain by the common usage of the two receptors IL-2R β and γ_c . Cytokine specificity is conferred by private alpha chains. IL-2R α exists in a soluble form shed from the membrane-bound form. In this study, we identify *in vitro* and then *in vivo* a soluble form of the IL-15R α , stemming from membrane-bound IL-15R α , a strong antagonist of IL-15 activity. The N-terminal domain of IL-15R α (sIL-15R α), in combination with IL-15 exerts an agonistic effect on IL-2R β / γ_c expressing cells, an effect strenghtened by covalently linking IL-15 to sIL-15R α . This work shows that sIL-15R α important rolesi . . of IL-15 activity and could lead to therapeutic applications.

INTRODUCTION

LES CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS

Le fonctionnement d'un organisme vivant est régi par un équilibre complexe et hautement régulé entre les différentes cellules qui le constituent. Ainsi, le système immunitaire repose sur l'interaction entre les effecteurs cellulaires que sont les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules naturelles tueuses ou NK (Natural Killer) et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. La communication entre ces différentes cellules est assurée soit par contacts directs, soit médiée par des facteurs protéiques solubles. Ces molécules transmettent leur signal via des protéines transmembranaires spécifiques, ou récepteurs. L'intégration de ces différents signaux génère un message qui aboutit à différents effets comme l'activation de la prolifération, la différenciation et la maturation fonctionnelle des cellules (induction d'activités cytotoxique et phagocytaire, production d'anticorps, l'accroissement de l'hématopoïèse).

I. Généralités.

A. Les cytokines.

Afin d'assurer le bon fonctionnement d'un organisme multicellulaire, il est nécessaire que les cellules établissent des moyens de communication entre elles. Hormis les contacts cellulaires, les facteurs solubles jouent un rôle prépondérant dans la diffusion de l'information. Ces facteurs peuvent être différenciés en trois catégories distinctes : les hormones endocriniennes possédant une action systémique, les facteurs de croissance et les cytokines, agissant localement. Le terme de cytokine désigne un ensemble de glycoprotéines solubles ou membranaires de faibles poids moléculaires qui présentent peu ou pas de similitudes dans leurs séquences en acides aminés (aa) et régulant un large spectre d'activités biologiques (prolifération, différenciation, réponses cellulaires).

Lorsqu'elles sont sécrétées, les cytokines peuvent agir à de très faibles concentrations sur les cellules avoisinantes (paracrinie) ou sur les cellules productrices elles-mêmes (autocrinie). Elles pourraient également agir à l'intérieur des cellules

productrices sans être secrétées (intracrine). Les cytokines sont rarement produites de manière constitutive mais plutôt en réponse à une activation cellulaire qui elle-même a pu être induite en cascade par d'autres cytokines. En effet, les cytokines peuvent réguler positivement ou négativement la production d'autres cytokines et dans certains cas réguler leur propre expression. L'ensemble des interactions entre les différentes cytokines forme le réseau cytokinique. Ce réseau de cytokines est également défini par le fait qu'une action simultanée de différentes cytokines peut aboutir à un effet additif, synergique ou antagoniste.

Les cytokines sont généralement regroupées selon leurs modes d'action et leurs fonctions biologiques. Ainsi les cytokines sont classées en six groupes ou familles (**Figure 1**) :

- les interleukines (IL-)
- les interférons (IFNs)
- les facteurs de nécrose des tumeurs (TNFs, "Tumor Necrosis Factors")
- les facteurs stimulant les colonies (CSFs, "Colony Stimulating Factors")
- les facteurs de croissance (GFs, "Growth Factors")
- les chimiokines

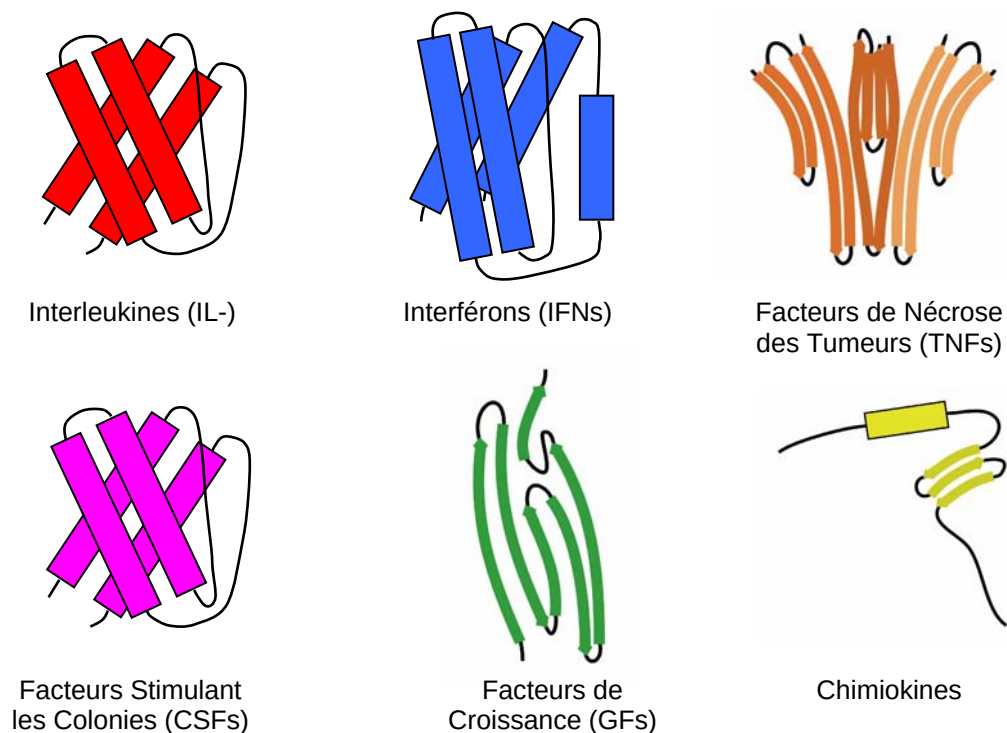


Figure 1 : Groupes ou Familles de Cytokines

En réponse à un stimulus adéquat, la production de la cytokine qui résulte d'une synthèse *de novo* sera, généralement, rapide, brève, intense et sa sécrétion sera immédiate. Hormis l'IL-1, les cytokines ne sont pas stockées à l'intérieur des cellules. Il existe cependant des cytokines qui sont exprimées de façon basale, comme celles qui sont produites par les cellules stromales du microenvironnement médullaire ou thymique. La majorité des cytokines sont des facteurs solubles sécrétés, cependant certaines peuvent se présenter sous deux formes, soluble et membranaire, toutes deux biologiquement actives.

De manière générale, l'expression des cytokines est régulée de manière transcriptionnelle. Cependant il existe des cas de régulation post-transcriptionnelle via la stabilisation d'ARNm (GM-CSF, IL-7, IL-15) ou post-traductionnelle via un clivage protéolytique. Ce clivage peut être celui d'une pro-cytokine afin de libérer la cytokine mature, ou celui du domaine extracellulaire d'une forme membranaire permettant le relargage de la cytokine soluble mature.

Au fur et à mesure de la découverte de cytokines, de récepteurs, ou de nouveaux modes d'action et d'interaction, le réseau cytokinique apparaît de plus en plus complexe.

B. Les récepteurs de cytokines.

Les cytokines exercent leur action par l'intermédiaire de récepteurs localisés à la surface des cellules. De façon similaire aux cytokines, les récepteurs membranaires peuvent être classés selon leurs homologies structurales et fonctionnelles. Ainsi les chaînes réceptrices des cytokines sont regroupées en neuf familles principales (**figure 2**).

a) Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques (récepteurs de classe I) comme la chaîne gp130, la chaîne β commune (β_c) et la chaîne γ commune (γ_c).

b) Les récepteurs des cytokines des familles des IFNs et de l'IL-10 (récepteurs de classe II) tels les IFN-Rs, IL-10R, IL-20R, IL-22R et IL-28R.

c) Les récepteurs des cytokines de la superfamille des TNFs (récepteurs de classe III) qui correspondent par exemple aux TNF-R, NGF-R, Fas, CD27, CD40 et TRAIL-R.

d) Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines sans activité tyrosine kinase comme les IL-1Rs et IL-18R.

e) Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines avec activité tyrosine kinase qui correspondent entre autres aux M-CSF-R, EGF-R et PDGF-R .

f) Les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF β comprenant par exemple les TGF β -R, Inh-R et Act-R.

g) Les récepteurs à domaine sushi dont l'IL-2R α et l'IL-15R α sont les seuls membres.

h) Les récepteurs des cytokines de la famille des IL-17 (IL-17Rs).

i) Les récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines comme le CXCR-1, les CCRs, les CXCRs et le CX₃CR-1.

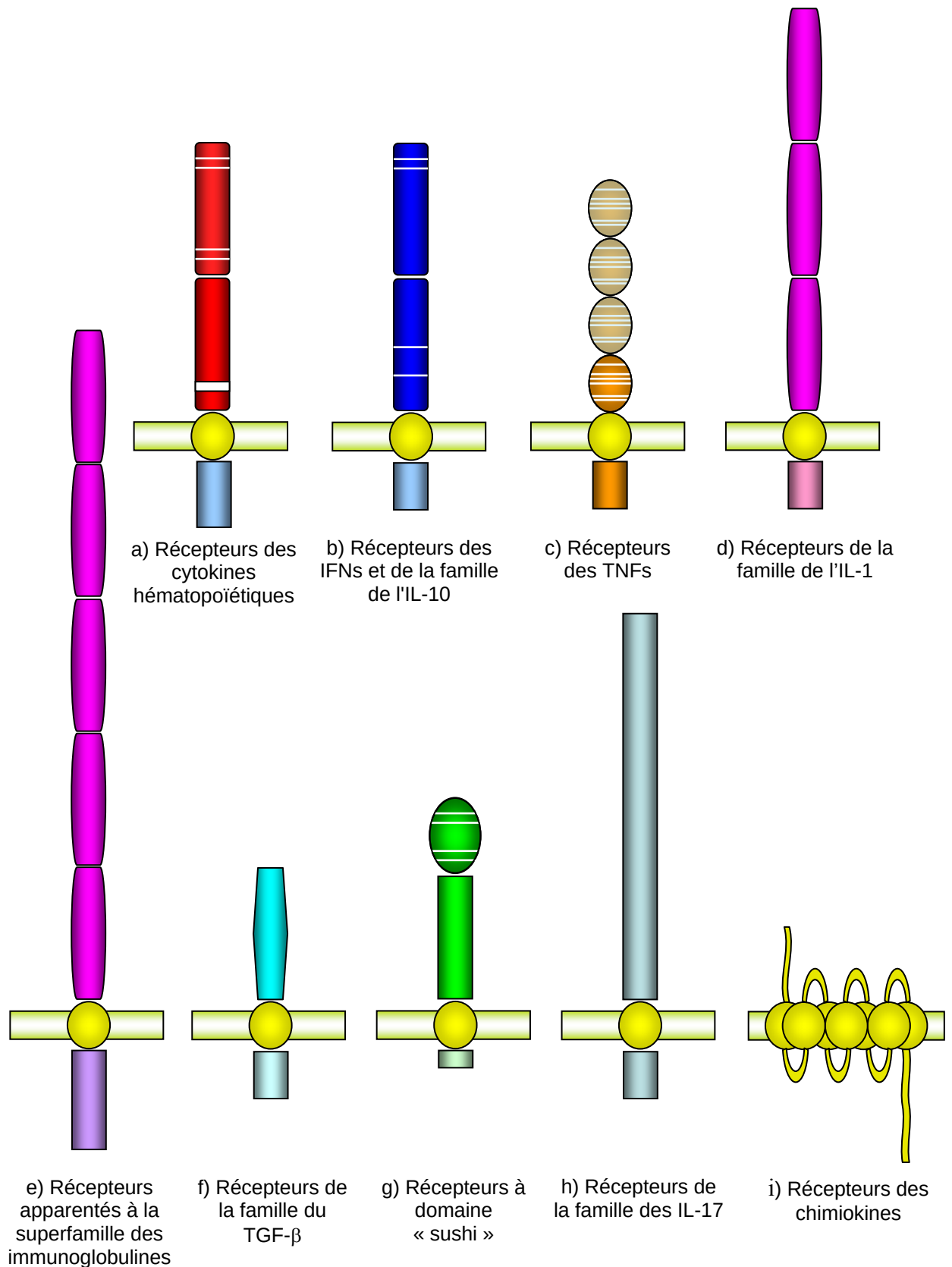


Figure 2 : Familles de Chaînes Réceptrices Membranaires des Cytokines.

II. Les cytokines hématopoïétiques.

Ce travail de thèse s'est intéressé à l'étude du "système interleukine-15". L'IL-15 est une cytokine hématopoïétique à quatre hélices α courtes, structurellement et fonctionnellement proche de l'IL-2 (Burton *et al.* 1994; Grabstein *et al.* 1994). Les récepteurs fonctionnels de l'IL-2 et de l'IL-15 partagent les chaînes transductrices IL-2R β et γ_c , de la famille des récepteurs hématopoïétiques (Bamford *et al.* 1994; Giri *et al.* 1994; Grabstein *et al.* 1994). Leur spécificité de réponse est conférée par leurs chaînes réceptrices spécifiques, l'IL-15R α et l'IL-2R α .

A. Caractéristiques des cytokines hématopoïétiques.

Les cytokines hématopoïétiques sont des protéines de faible poids moléculaire impliquées dans la différenciation et l'expansion des cellules sanguines. Elles présentent généralement des N-glycosylations et O-glycosylations et la structure tertiaire de la plupart de ces glycoprotéines est assurée par des ponts disulfures. L'organisation spatiale des structures secondaires donne une structure tertiaire cylindrique aux cytokines à hélices α longues, et une structure tertiaire globulaire aux cytokines à hélices α courtes. Ces cytokines se fixent généralement sous forme monomérique sur différentes chaînes réceptrices hématopoïétiques.

B. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques.

1. Structure des chaînes réceptrices.

Les chaînes réceptrices de la famille des cytokines hématopoïétiques sont des glycoprotéines contenant une seule région transmembranaire à l'exception de la chaîne CNTF-R qui est ancrée à la membrane par une liaison glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Les régions extracellulaires de ces chaînes réceptrices sont variables, mais présentent toutes un module de type "Cytokine Receptor Homology" (CRH), constitué par deux domaines de type hématopoïétique et impliqué dans la liaison de la cytokine. Le premier

domaine hématopoïétique, situé en NH₂-terminal, présente quatre cystéines conservées qui forment deux ponts disulfures intracaténaux successifs indispensables à la fonctionnalité du CRH (Yawata *et al.* 1993). Le second domaine hématopoïétique, plus proche de la membrane et possède un motif W-S-X-W-S conservé spécifique des récepteurs hématopoïétiques.

Des domaines de type "immunoglobuline" (Ig) et/ou des domaines de type "fibronectine III" (FNIII) sont retrouvés dans les régions extracellulaires de certaines chaînes réceptrices de la famille des cytokines hématopoïétiques. Les domaines Ig peuvent également jouer un rôle dans la liaison de la cytokine (Layton *et al.* 2001; Bitard *et al.* 2003) alors que les régions de type FNIII peuvent permettre des interactions entre les chaînes réceptrices (Kurth *et al.* 2000; Timmermann *et al.* 2002).

Les parties intracellulaires des chaînes réceptrices hématopoïétiques sont de longueurs variables et ne présentent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Deux motifs conservés, "Box1" et "Box2", sont retrouvés sur les domaines intracellulaires chaînes réceptrices hématopoïétiques qui participent à la transduction du signal biologique. Le motif "Box1" possède un site, riche en proline, essentiel à la transduction du signal en permettant l'ancrage de protéines tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille des JAKs ("Janus-Associated Kinases"). Le motif "Box2", moins conservé, augmenterait l'affinité des JAKs pour la région intracytoplasmique des chaînes transductrices (Bazan 1990).

2. Les familles de récepteurs hématopoïétiques.

Afin de transduire un signal, les récepteurs hématopoïétiques fonctionnels induisent l'homodimérisation d'une chaîne spécifique ou l'association de deux ou trois chaînes réceptrices différentes. La spécificité d'interaction des complexes récepteurs multimériques avec la cytokine est conférée par la chaîne α . Dans le cas des récepteurs trimériques, cette chaîne a un domaine intracellulaire court et dépourvu, le plus souvent, d'activité transductrice. Elle s'associe, alors, dans le récepteur fonctionnel à un homo ou hétérodimère de chaînes transductrices. La liaison de la cytokine peut induire le rapprochement des chaînes transductrices, ou entraîner des modifications de la conformation et du positionnement des chaînes transductrices pré-associées qui permettent le rapprochement des régions intracellulaires. Le rapprochement des parties intracytoplasmiques permet l'initiation de la transduction du signal intracellulaire en permettant

aux JAKs constitutivement associées aux chaînes réceptrices d'interagir et de s'auto-activer.

Les chaînes transductrices peuvent être partagées par plusieurs cytokines. Cette propriété, à la base de la redondance fonctionnelle entre différentes cytokines, ainsi que la nature dimérique ou trimérique des récepteurs, permet de définir quatre groupes principaux de cytokines hématopoïétiques (Ozaki and Leonard 2002) :

- **Le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteurs homodimériques** comprend les cytokines hématopoïétiques homodimérisant leur chaîne réceptrice unique qui est transductrice. Ce groupe comprend l'EPO, le TPO, le G-CSF, la GH, la PRL et la Leptine.

- **Le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteurs hétérodimériques utilisant la chaîne transductrice β_c .** Les cytokines de ce groupe sont l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF. Chaque cytokine possède une chaîne réceptrice spécifique (chaîne α) qui associée à la chaîne β_c forme le complexe récepteur fonctionnel.

- **Le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteurs hétérodimériques ou hétérotrimériques utilisant la chaîne transductrice γ_c .** Ces cytokines sont l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. La chaîne réceptrice spécifique de chaque cytokine est appelée chaîne réceptrice α . L'IL-2 et l'IL-15 partagent, en plus de la chaîne γ_c , la chaîne transductrice IL-2R β .

- **Le groupe des cytokines à récepteurs multimériques** correspond à la famille IL-6/IL-12. La famille de l'IL-6 comprend, en plus de cette cytokine, l'IL-11, le CNTF, le LIF, l'OSM, la CT-1, et la CLC sécrétée uniquement si elle est complexée au "Cardiotrophin-Like Factor-1" (CLF-1) ou au CNTF-R. Deux homologues viraux de l'IL-6 sont connus : la "Kaposi Sarcoma associated human herpes Virus 8 interleukin-6" (KSHV-IL-6) et la "Rhesus macaque rhadinovirus Interleukin-6" (Rm-IL-6). Toutes ces cytokines partagent la chaîne transductrice gp130, et certaines partagent la chaîne transductrice gp190. La CT-1 posséderait une chaîne spécifique non déterminée qui serait ancrée à la membrane plasmique par une liaison GPI déjà décrite pour le CNTF-R membranaire (Pennica *et al.* 1996; Robledo *et al.* 1997).

L'IL-12, l'IL-23 et l'IL-27 sont des cytokines dont les structures sont comparables à celle d'un complexe cytokine/récepteur soluble. La structure et le mode d'utilisation des récepteurs spécifiques solubles permettent de rapprocher la famille de l'IL-6 de celle de l'IL-12. En effet, l'IL-12 correspond à l'association covalente, par ponts disulfures, des

sous-unités IL-12p35, qui présente des homologies de structure avec l'IL-6, et IL-12p40 structuralement proche de l'IL-6R α soluble. L'IL-23 et l'IL-27 sont aussi formés de l'association d'une molécule de type cytokine avec une protéine de type récepteur soluble.

C. La transduction du signal des cytokines hématopoïétiques.

La liaison de la cytokine sur son récepteur fonctionnel provoque un signal, qui est transmis à l'intérieur de la cellule afin que celle-ci réponde de manière adaptée. La transduction du signal qui met en jeu différentes voies d'activation doit être finement régulée afin que l'activation soit suffisante (Ihle *et al.* 1995; Gadina *et al.* 2001).

Les régions intracellulaires des chaînes réceptrices hématopoïétiques transductrices sont constitutivement associées avec des protéines tyrosine kinases, les JAKs. Les JAKs possèdent une activité kinase en C-terminal. La dimérisation des chaînes transductrices suite à la liaison de la cytokine sur le complexe récepteur fonctionnel permet le rapprochement de leurs parties intracytoplasmiques et des JAKs. Cela induit l'activation des JAKs par phosphorylations mutuelles. Cette première étape de recrutement de molécules de signalisation peut conduire à l'engagement des trois principales voies d'activation des cytokines hématopoïétiques : la voie des STATs ("Signal Transducers and Activators of Transcription"), la voie des MAPKs ("Mitogen-Activated Protein Kinases"), et la voie de la PI3-K ("Phosphatidyl Inositol 3-Kinase") et de Akt ("cellular homolog of the v-akt oncogene" ou PKB pour "Protein Kinase B"). Il s'en suit une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de différents facteurs de transcription dans le noyau.

L'information intercellulaire correspondant à la fixation de la cytokine sur son récepteur fonctionnel peut être régulée négativement de différentes façons: (i) Certaines cytokines peuvent être complexées à des récepteurs solubles antagonistes ou être captées par des récepteurs membranaires non fonctionnels ("decoy receptors"). (ii) La quantité des différents éléments participant à la transduction du signal intracellulaire peut être contrôlée, par dégradation au niveau du protéasome. (iii) L'information intercellulaire peut être contrôlée négativement voire rétrocontrôlée au niveau même de la transduction du signal intracellulaire.

LE SYSTEME IL-15

L'IL-15 est une cytokine de la famille de l'IL-2 qui a été découverte, en 1994, simultanément par deux équipes (Burton *et al.* 1994; Grabstein *et al.* 1994). Elle a été identifiée sur la capacité des surnageants de culture des lignées CV-1 / EBNA (lignée épithéliale de rein de singe) et Hut-102 (Lymphome T humain associé au virus HTLV-1 ("Human T Cell Leukemia Virus")), à induire la prolifération de la lignée T cytotoxique murine IL-2 dépendante, CTLL-2 (Bamford *et al.* 1994). Cette cytokine possède de nombreuses activités biologiques communes avec l'IL-2, principal facteur de croissance des lymphocytes T activés. Cette redondance fonctionnelle entre ces deux cytokines s'explique, entre autre, par le fait qu'elles partagent des chaînes réceptrices communes, IL-2/15R β et γ c (Giri *et al.* 1994). L'IL-15 possède, néanmoins, des propriétés qui lui sont propres, médiées, notamment, par une chaîne IL-15R α spécifique.

I. L'Interleukine-15.

A. Caractéristiques moléculaires et biochimiques de l'IL-15 humaine.

1. Caractéristiques du gène et des messagers de l'IL-15.

L'IL-15 est codée par un gène d'environ 34 kb localisé sur le chromosome 4 en position q13 chez l'homme, et dans la région centrale du chromosome 8 murin. Le gène humain est composé de 9 exons dont 7 sont codants et 8 introns (Anderson *et al.* 1995; Krause *et al.* 1996). Il a été mis en évidence l'existence d'un exon alternatif, chez l'homme et la souris, présenté comme étant une séquence additionnelle localisée entre les exons 4 et 5 et codant pour un peptide signal, nommé exon 4A (Meazza *et al.* 1996; Onu *et al.* 1997; Tagaya *et al.* 1997). Selon l'utilisation ou non de l'exon 4A, deux isoformes d'ARNm sont produites.

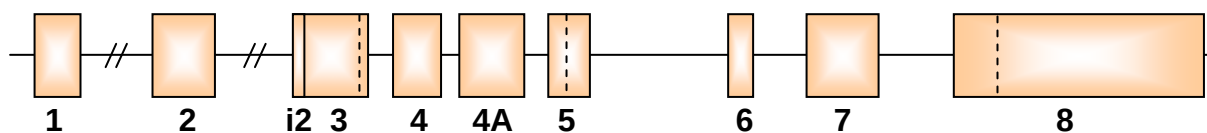
L'ADNc originel de l'IL-15 humaine comprend une région 5' non traduite (5' UTR) d'au moins 316 nucléotides (nt), une séquence codante (ORF) de 486 nt, et une

région 3' non traduite (3' UTR) d'au moins 400 pb, codant pour un précurseur de l'IL-15. Ce précurseur est constitué d'un peptide signal de 48 aa et d'une protéine mature de 114 aa. Le peptide signal est codé par les exons 3, 4 et le début de l'exon 5. La fin de l'exon 5 et les exons 6, 7 et 8 codent pour la protéine mature (Grabstein *et al.* 1994; Anderson *et al.* 1995).

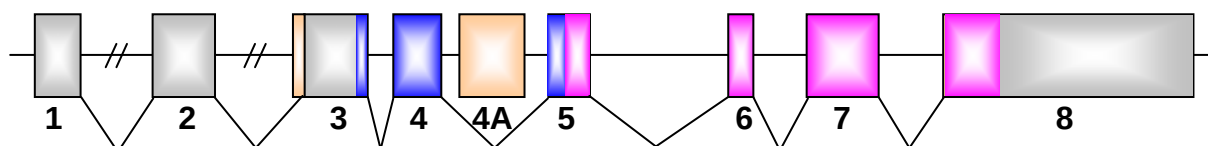
L'ADNc alternatif humain de l'IL-15 a été identifié présentant un exon additionnel de 119 nucléotides (nt) inséré entre les exons 3 et 4, mais étant dépourvu des exons 1 et 2. L'introduction de cet exon alternatif engendre l'interruption de la séquence codant pour le peptide signal de 48 aa par l'insertion de 3 codons stop et fait apparaître un nouveau site d'initiation de la traduction, AUG. Il en résulte un précurseur de l'IL-15 présentant un peptide signal plus court de 21 aa par rapport au peptide signal de 48 aa, dit long. Les deux isoformes de l'IL-15 sont appelées IL-15-LSP ("Long Peptide Signal") et IL-15-SSP ("Short Peptide Signal") et donnent une protéine mature identique (Anderson *et al.* 1995; Krause *et al.* 1996) (**Figure 3**).

La structure du gène de l'IL-15 (9 exons et 8 introns) est différente de celle retrouvée généralement pour les gènes des cytokines à 4 hélices α (4 exons et 3 introns). Néanmoins, la région génique codant pour l'IL-15 mature correspond à 4 exons et 3 introns (Seigel *et al.* 1984).

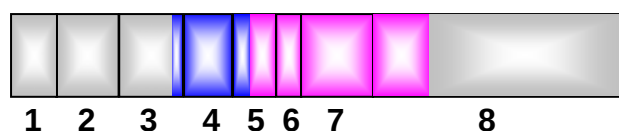
Gène de l'IL-15 humaine



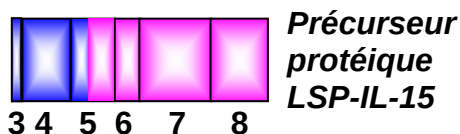
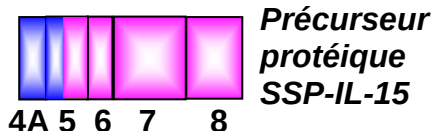
ADN



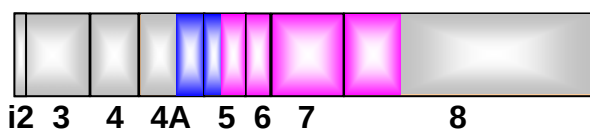
Transcription

ARNm LSP-IL-15
(Anderson et al., 1995)

Traduction

Précurseur
protéique
LSP-IL-15Précurseur
protéique
SSP-IL-15

Traduction

ARNm SSP-IL-15
(Meazza et al., 1996)

Transcription

ADN

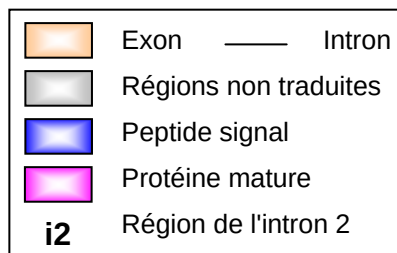
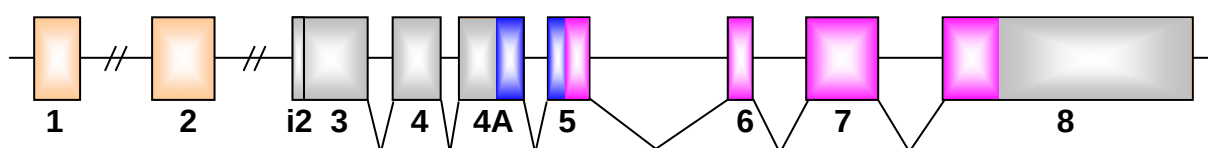


Figure 3 : Gène, Transcription, Traduction et Maturation Protéique de l'IL-15 Humaine.

2. Caractéristiques protéiques de l'IL-15.

a) Forme soluble.

L'IL-15 mature est une glycoprotéine de 14-15 kDa composée de 114 aa codée par les exons 5 à 8 du gène de l'IL-15. L'IL-15 humaine et du singe ne diffèrent que par 5 aa et présentent ainsi, 97% d'homologie. Entre l'homme et la souris, on observe 73% d'homologie au niveau de la séquence en acide aminé (Grabstein *et al.* 1994). L'IL-15 comporte deux ponts di-sulfure en position C42-C88 (homologue à l'IL-2 situé en C58-C105) et C35-C85, et présente deux sites de N-glycosylation en C terminal de la protéine, en N79 et N112 (Grabstein *et al.* 1994). Les prédictions sur la structure secondaire de l'IL-15 mature indiquent qu'elle appartient, au même titre que l'IL-2, à la famille des cytokines composées de quatre hélices α courtes amphipatiques. Pour l'IL-15, les hélices α sont localisées entre les acides aminés N1 et L15, T38 et A57, N65 et G78, et K97 et S114, en configuration « up-up-down-down » (Pettit *et al.* 1997).

Bien que l'IL-2 et l'IL-15 présentent une faible homologie de séquence primaire, les acides aminés de l'IL-2, essentiels à la liaison des chaînes réceptrices et γ_c , sont conservés dans la structure de l'IL-15. Ainsi, le D8 de l'IL-15, homologue de D20 de l'IL-2, est indispensable à l'interaction avec IL-2R β (Zurawski *et al.* 1993; Pettit *et al.* 1997). De même, Le Q108 de l'IL-15, homologue du Q126 de l'IL-2, est essentiel à la liaison à la chaîne γ_c (Zurawski *et al.* 1993). Les résidus participant à la liaison spécifique entre l'IL-2 et sa chaîne α (K35, R38, F42 et K43) localisés dans la boucle entre les hélices A et B, ne sont pas conservés pour l'IL-15 (Sauve *et al.* 1991). Dans une précédente étude, nous avons identifié deux régions de l'IL-15 impliquées dans la liaison à l'IL-15R α . La première région (⁴⁴LLELQVISL⁵²) correspond à une séquence localisée dans l'hélice B and la seconde (⁶⁴ENLI⁶⁸) est située dans l'hélice C (Bernard *et al.* 2004).

b) Forme membranaire.

Une forme membranaire de l'IL-15 a été mise en évidence à la surface de monocytes humains primaires, de lignées humaines monocytaires et de myofibroblastes dérivés de la rate (Musso *et al.* 1999; Briard *et al.* 2002). L'expression de l'IL-15 membranaire constitutive est accrue lors de l'activation de ces cellules par de l'IFN γ ou du LPS. Un stock intracellulaire d'IL-15 est mobilisé rapidement à la surface des monocytes

suite à une stimulation au LPS ou au GM-CSF. Cette IL-15 membranaire est biologiquement active et assure la prolifération des lymphocytes T (Neely *et al.* 2001). De plus, cette IL-15 cross-linkée à un anticorps anti-IL-15 ou stimulée par une forme soluble de l'IL-15R α induit les monocytes, par un processus de rétro-signal, à adhérer à leur support et à produire de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- α (Budagian *et al.* 2004; Neely *et al.* 2004). Le mécanisme de mobilisation à la membrane reste encore inconnu.

L'IL-15 peut être présentée, fixée à sa chaîne IL-15R α membranaire, et stimuler en *trans* des cellules exprimant des complexes récepteurs IL-15R α /IL-2R β / γ_c et IL-2R β / γ_c (Dubois *et al.* 2002). Ainsi, la présentation de l'IL-15 par la chaîne IL-15R α permet la stimulation en *trans* des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Burkett *et al.* 2003) (**Figure 4C**).

B. Sites d'expression de l'IL-15.

L'ARN messenger de l'IL-15 est détecté dans de nombreux tissus et types cellulaires après activation. Des tissus comme le placenta, le muscle squelettique, le rein, le foie, le poumon, le cœur présentent une expression forte d'ARNm de l'IL-15 (Grabstein *et al.* 1994).

À l'échelle cellulaire, les monocytes/macrophages sous activation ont été les premières cellules reconnues comme source d'IL-15 (Grabstein *et al.* 1994). D'autres cellules impliquées dans la présentation de l'antigène (CPA), comme les cellules dendritiques produisent de l'ARNm et la protéine IL-15, suggérant un rôle dans l'attraction et la stimulation des cellules T. L'IL-15 est également produite par les lignées de cellules stromales, ainsi que les cellules humaines primaires stromales de la moelle osseuse, par les épithéliums thymique et intestinal fœtal. Les cellules épithéliales et fibroblastiques issues de divers tissus, comme les lignées épithéliales hépatiques, les cellules épidermiques et les kératinocytes, les cellules fœtales de la peau, les cellules épithéliales intestinales, expriment l'IL-15 au niveau ARNm et/ou protéique. D'autres cellules moins étudiées produisent de l'IL-15, comme les astrocytes et les cellules de la microglie. Bien que la présence d'ARNm dans les cellules T périphériques activées n'avait pas été détectés lors d'études préliminaires, des techniques plus sensibles ont montré l'existence d'ARNm de l'IL-15 sans toutefois détecter la protéine.

Cette expression ubiquitaire des ARNm contraste avec la détection de la protéine qui est très rarement dosée dans des conditions physiologiques. Cependant, l'IL-15

protéique a été dosée dans les surnageants de culture de cellules stromales de la moelle osseuse, de cellules dendritiques dérivées du sang, et de monocytes/macrophages activés. La quantité de protéine sécrétée est généralement le reflet du taux d'ARNm et de la stabilité des transcrits. Dans le cas de l'IL-15, la présence ubiquitaire d'ARNm et l'absence de la protéine suggèrent que la production d'IL-15 soit fortement régulée au niveau post-transcriptionnel.

C. Régulation de l'expression de l'IL-15.

La transcription, la traduction et la sécrétion de l'IL-15 sont régulées par de multiples mécanismes complexes et aboutissent à terme à une faible sécrétion de la cytokine.

1. Régulation transcriptionnelle de l'expression de l'IL-15.

L'induction de la transcription du gène de l'IL-15 est permise sous certaines conditions. Les monocytes présentent un taux plus élevé d'ARNm suite à une stimulation par le LPS ou l'IFN γ (Grabstein *et al.* 1994; Bamford *et al.* 1996), ou à une infection virale ou microbienne (Doherty *et al.* 1996; Flamand *et al.* 1996). Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien foetal activées par l'IFN γ ou le TNF α augmentent leur taux d'expression de transcrits de l'IL-15 (Kumaki *et al.* 1996). Le LPS et les IFN $\alpha\beta$ induisent une augmentation des messagers IL-15 dans les cellules dendritiques (Mattei *et al.* 2001). Les rayonnements UV favorisent, également l'expression des ARNm de l'IL-15 par les kératinocytes (Mohamadzadeh *et al.* 1995).

Des études sur la recherche de séquences consensus au niveau de la région 5' régulatrice en amont de l'exon 1, ont révélé l'existence de sites de fixation de facteurs de transcription dans la région promotrice : α -INF-2, NF-IL-6, γ -IRE, myb, GCF, IRF-1, et NF- κ B (Azimi *et al.* 1998; Washizu *et al.* 1998). Le site NF- κ B est localisé en -75 et -65 par rapport au site d'initiation de la transcription du promoteur du gène humain de l'IL-15. Il a été décrit comme étant important pour la régulation positive de l'expression de l'ARNm de l'IL-15 induite par la protéine Tax du virus HTLV-1 (Azimi *et al.* 1998) et de l'expression du gène IL-15 induit par l'activation LPS des macrophages murins (Washizu

et al. 1998). Un motif IRF-E ("Interferon Regulatory Factor response Element") est localisé dans la région -295 à -243 par rapport au site d'initiation de la transcription du gène de l'IL-15 murine. Il fixe les protéines IRF-1 et IRF-2. IRF-1 joue un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle de l'IL-15. L'expression d'IL-15 induite par IRF-1 est importante pour les cellules NK, NK-T, et les IELs (Ogasawara *et al.* 1998; Ohteki *et al.* 1998). La région -201 à -141 du promoteur du gène de l'IL-15 comporte des sites non identifiés de régulation négative de l'expression de l'IL-15 (Azimi *et al.* 1998). La délétion en 5' de cette région résulte en une forte augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'IL-15.

Un autre type de régulation négative de la transcription du gène de l'IL-15 a été récemment mis en évidence chez la souris. Une IL-15 non sécrétée issue d'un épissage alternatif inhibe la production d'IL-15 induit par le LPS au niveau transcriptionnel. La co-expression de l'IL-15R α est indispensable à cette inhibition. Cette IL-15 intracellulaire formerait un complexe avec l'IL-15R α et serait transloqué dans le noyau. Le complexe inhiberait la transcription du gène de l'IL-15 en empêchant les facteurs de transcription de se fixer sur le promoteur IL-15 (Nishimura *et al.* 2005).

2. Régulation traductionnelle de l'expression de l'IL-15.

La forte expression de l'ARNm de l'IL-15 et la faible détection de la protéine ont mené à étudier les mécanismes régulant la traduction des messagers de l'IL-15. La présence de multiple codons start AUG au niveau de la séquence 5' non traduite et le comportement différent des isoformes LSP et SSP ont été identifiés comme des points de contrôle en tant que régulateur de la traduction des ARNm de l'IL-15 en précurseur de la protéine IL-15.

La région 5' non traduite de l'ARNm de l'isoforme LSP de l'IL-15 est relativement longue. Elle contient 12 codons d'initiation de la traduction AUG dont 10 surnuméraires chez l'homme (5 chez la souris) en amont du codon d'initiation de la traduction (Grabstein *et al.* 1994; Bamford *et al.* 1996). La présence de ces codons AUG a tendance à réduire fortement l'efficacité de la traduction (Kozak 1992). Des travaux ont montré que la production de la protéine de fusion HTLV-1 / IL-15 par la lignée HuT-102 provient de

l'augmentation de l'efficacité de transcription induite par la protéine virale Tax, mais également d'une traduction accrue (Bamford *et al.* 1996). L'ARNm de fusion est constitué d'une séquence virale de 118 nt qui s'intègre dans la région 5' non traduite du gène de l'IL-15. Cette insertion provoque la délétion de 8 des 10 codons AUG surnuméraires, ce qui permet l'augmentation de la traduction protéique.

Les peptides signaux des deux isoformes de l'IL-15, LSP-IL-15 et SSP-IL-15, contribueraient à l'inefficacité de la traduction. Le peptide signal long possède un codon AUG localisé dans une région présentant peu d'homologie avec la séquence Kozak (Onu *et al.* 1997; Tagaya *et al.* 1997). La LSP-IL15 est ainsi moins bien traduite que la forme SSP-IL-15. De plus, le remplacement des peptides signaux endogènes de l'IL-15 par celui de l'IL-2 résulte en l'augmentation critique d'IL-15

La combinaison des deux modifications de l'ARNm de l'IL-15, en addition avec la suppression des AUG dans la région 5' non traduite, entraîne une synthèse d'IL-15 accrue de 250 fois par rapport à la construction sauvage avec une région 5' non traduite intacte.

3. Régulation post-traductionnelle de l'expression de l'IL-15.

La suppression des régulations traductionnelles des ARNm de l'IL-15 entraîne une augmentation de la production de la cytokine. Néanmoins, la traduction et la sécrétion de l'IL-15 restent faibles par rapport aux autres cytokines (Bamford *et al.* 1998). La production d'IL-15 subit une régulation également au stade post-traductionnel.

Les peptides signaux de l'IL-15 contribuent à l'inefficacité de la sécrétion de la cytokine. La substitution des séquences codantes des peptides signaux de l'IL-15 par ceux de l'IL-2, du CD33, ou de la chaîne IgV κ augmente non seulement la traduction mais également la sécrétion de l'IL-15 (Meazza *et al.* 1997; Onu *et al.* 1997; Bamford *et al.* 1998). Inversement, le remplacement du peptide signal de l'IL-2 par le peptide signal long de l'IL-15 diminue fortement la sécrétion de l'IL-2 (Bamford *et al.* 1998). La nature du peptide signal de l'IL-15 détermine également le trafic intracellulaire de la protéine mature (Meazza *et al.* 1997; Onu *et al.* 1997; Tagaya *et al.* 1997; Gaggero *et al.* 1999). L'IL-15 issue de l'ARNm SSP-IL-15 est détectée uniquement au niveau du cytoplasme et du noyau

mais n'est pas sécrétée. Cette forme d'IL-15 régule négativement la production de la cytokine et tend à diminuer les défenses immunitaires *in vivo*. Elle a été détectée dans le coeur, le thymus, l'appendice, les testicules et les lymphoblastes humains (Nishimura *et al.* 2000). L'ARNm LSP-IL-15 est plus faiblement traduit. Le précurseur protéique est dirigé vers la voie sécrétoire en passant par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. On retrouve les transcrits LSP-IL-15 dans le muscle squelettique, le placenta, le coeur, le poumon, le foie, le thymus et les reins (Grabstein *et al.* 1994). Cette forme sécrétée est impliquée *in vivo* dans la défense immunitaire contre les infections microbiennes (Nishimura *et al.* 2000). Le trafic intracellulaire du transcrit LSP-IL-15 est complexe, et la sécrétion de la cytokine reste faible. En effet, les précurseurs protéiques LSP-IL-15 peuvent être dirigés dans trois voies de routage différents (Kuryl *et al.* 2000). Une partie des LSP-IL-15 n'est pas glycosylée, reste dans le cytoplasme et est dégradée par les protéasomes. Une autre partie est N-glycosylée mais le peptide signal subirait un clivage partiel. Elles pourraient, ainsi, être stockées ou bien dégradées avant d'être sécrétées. Une troisième partie des précurseurs protéiques suivrait la voie classique de sécrétion. Ces précurseurs seraient N-glycosylés et subiraient un clivage complet du peptide signal et enfin seraient sécrétés.

La partie carboxy-terminale de l'IL-15 mature régulerait négativement la sécrétion de la cytokine, en agissant comme un signal de rétention. En effet l'ajout d'une séquence protéique en COOH de l'IL-15, comme le marqueur fluorescent GFP (Gaggero *et al.* 1999) ou un marqueur antigénique "flag" (Bamford *et al.* 1998) augmente la sécrétion d'IL-15.

Le niveau élevé de régulation de l'expression de l'IL-15 participe à la difficulté de détection de l'IL-15 dans les surnageants de culture et liquides biologiques. Des molécules solubles, telles que des formes solubles de récepteur, pourraient également fixer l'IL-15 et la rendre indétectable par les dosages (type ELISA) actuellement utilisés. Une partie de ce travail a permis d'évaluer cette hypothèse.

II. Les Récepteurs de l'IL-15.

Les cytokines, comme l'IL-15, manifestent une importante pléiotropie et une forte redondance contrôlant un large champ de fonctions dans diverses cellules. La redondance est expliquée en partie par le partage de chaînes réceptrices parmi les membres d'une

même famille de cytokine. Chaque cytokine possède sa propre chaîne réceptrice, mais partage une voire plusieurs chaînes communes à d'autres cytokines. Les similitudes fonctionnelles entre l'IL-2 et l'IL-15 laissaient suggérer des éléments communs au niveau de leur récepteur. En effet, il a été mis en évidence une participation des chaînes β et γ_c du récepteur de l'IL-2 dans la structure et la fonction du récepteur de l'IL-15 (Bamford *et al.* 1994; Giri *et al.* 1994; Grabstein *et al.* 1994). L'association de ces deux chaînes constitue un récepteur fonctionnel d'affinité intermédiaire pour l'IL-2 ($K_d = 10\text{nM}$) et pour l'IL-15 ($K_d = 4\text{nM}$) (Balasubramanian *et al.* 1995; de Jong *et al.* 1996). Des travaux ultérieurs ont montré que l'IL-15 était capable de se lier avec une haute affinité sur des cellules d'une lignée lymphocytaire B, n'exprimant pas la chaîne γ_c . Nonobstant le fait que l'IL-2 et l'IL-15 partagent des chaînes réceptrices communes, ces deux cytokines présentent des activités biologiques différentes (Bulfone-Paus *et al.* 1997). Fort de ces observations, l'existence d'une sous-unité réceptrice spécifique à l'IL-15, lui conférant une fonction propre, a été suspectée. Ainsi, des travaux ont permis d'identifier la chaîne IL-15R α , spécifique et capable de lier l'IL-15 avec une forte affinité (Anderson *et al.* 1995; Giri *et al.* 1995).

A. Le récepteur de l'IL-15 commun au récepteur de l'IL-2.

1. La chaîne γ_c réceptrice (CD132).

La chaîne γ_c est partagée par de nombreux récepteurs de cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 et IL-21) (**Figure 4A**). C'est une glycoprotéine membranaire de type I de 64 kDa. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome X en position q13.1 (Takeshita *et al.* 1992), constitué de 8 exons et 7 introns (Noguchi *et al.* 1993). C'est une molécule qui totalise 369 aa, la protéine mature comporte 347 aa et le peptide signal 22 aa. La partie extracellulaire de la chaîne est composée de 233 aa et présente un module CRH (**Figure 4B**). Dans ce domaine, on retrouve 6 sites potentiels de glycosylation. Le domaine transmembranaire de la molécule comporte 21 aa. Aucune séquence consensus permettant d'exprimer une activité tyrosine kinase n'a été identifiée dans la partie intracytoplasmique de 86 aa. Cependant, une séquence de type SH2 a été identifiée. Elle permet à la chaîne γ_c de se lier, par l'intermédiaire de phosphotyrosines, à des protéines de signalisation et ainsi d'induire la transduction du signal. La chaîne γ_c seule est inapte à transmettre le signal, il

est nécessaire qu'elle soit associée à une autre chaîne, la chaîne β . En effet, la cotransfection des chaînes β et γ_c dans des cellules COS est indispensable pour la fixation de l'IL-15. La chaîne γ_c est d'autant plus importante qu'elle est partagée par de nombreux récepteurs de cytokines et qu'un défaut d'expression provoque une immunodéficience combinée sévère ou X-SCID (« human X-linked Severe Combined ImmunoDeficiency ») (Noguchi *et al.* 1993).

Des travaux sur la chaîne γ_c ont permis d'identifier différentes caractéristiques de cette chaîne. Des études ont montré que les lymphocytes T CD4 présentent un pool important de chaînes γ_c intracellulaires mais sa translocation à la membrane plasmique ne se fait qu'après l'activation cellulaire et induction des gènes IL-2R α et IL-2R β (Bani *et al.* 1997). Il a également été identifié une isoforme de la chaîne γ_c p64, la p74. L'isoforme p74 de la chaîne γ_c semble remplacer la p64 dans la lignée TF-1 β 2 (TF-1 transfectées pour exprimer IL-2R β et cultivées en IL-2) (Monson *et al.* 2001). Deux transcrits de la chaîne γ_c ont été caractérisés par la présence (γ_c -long) ou l'absence du site SH2 (γ_c -short) en C terminal de la protéine (Shi *et al.* 1997), dans les lymphocytes périphériques humains. Ces deux formes suggèrent une activation différentielle de voies de signalisation et pourrait jouer un rôle important dans la réponse cellulaire aux différentes cytokines γ_c dépendantes. Une forme soluble de la chaîne γ_c murine, qui résulte d'un clivage protéolytique de la forme membranaire, a été découverte dans les surnageants de culture de cellules T, B, NK et macrophages après activation (Meissner *et al.* 2001). La γ_c soluble possède comme propriété physiologique d'inhiber la prolifération des cellules dépendantes de cytokines γ_c dépendantes. Elle jouerait donc un rôle de régulation négative des cytokines exprimant la γ_c membranaire en entrant en compétition avec cette dernière.

La chaîne γ_c peut également entrer dans la composition d'un récepteur fonctionnel pour le GM-CSF (Giron-Michel *et al.* 2003). En effet, le GM-CSF inhibe la liaison de l'IL-2 sur le récepteur fonctionnel de l'IL-2 (Kanakura *et al.* 1993), dans la lignée promégacaryocytaire MO7e. De plus, un nouveau récepteur hybride, constitué de la chaîne β_c du GM-CSF et de la chaîne γ_c , a été mis en évidence dans les précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ humains. Dans les précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ et les TF-1 β (TF-1 transfectées pour exprimer IL-2R β et cultivées en GM-CSF), la phosphorylation de STAT5, induite par le GM-CSF, est partiellement inhibée par

l'utilisation simultanée d'anticorps anti- γ_c et anti-IL-2R β . De plus, la localisation induite par GM-CSF de STAT5 dans le noyau est fortement inhibée par le mélange des deux anticorps. Dans ces conditions, γ_c contribuerait principalement à la translocation de STAT5. Le partage de la chaîne transductrice γ_c par l'IL-15 et le GM-CSF participerait au développement hématopoïétique vers la voie myéloïde en bloquant l'engagement vers la voie lymphoïde (Giron-Michel *et al.* 2003).

2. La chaîne IL-2/15R β (CD122).

La chaîne réceptrice β est une glycoprotéine de 70-75 kDa (Tsudo *et al.* 1986; Dukovich *et al.* 1987). Son gène est localisé sur le chromosome 22 humain en position q11-12 et est organisé en 10 exons et 9 introns. Le précurseur protéique de 551 aa présente un peptide signal de 26 aa. La protéine mature de 525 aa est constituée, principalement, par un domaine CRH et présente 4 sites potentiels de N-glycosylation. Le domaine transmembranaire est composé de 25 aa. Le domaine intracellulaire de 286 aa est formé par une longue chaîne polypeptidique. Il est caractérisé par la présence de trois régions particulières riches en sérines, en acides aminés acides et en prolines, indispensables à la transduction du signal. La partie intracellulaire de la chaîne β est dépourvue de séquence consensus caractéristique des tyrosines kinase et contient 6 tyrosines (**Figure 4B**).

L'existence d'une forme soluble de la chaîne IL-2R β (p75) produite de manière endogène, 20 à 25 kDa plus petite que la forme totale, a également été mise en évidence (Honda *et al.* 1990). La génération du sIL-2R β est dépendante de l'activation cellulaire et est médiée par clivage protéolytique de la forme membranaire.

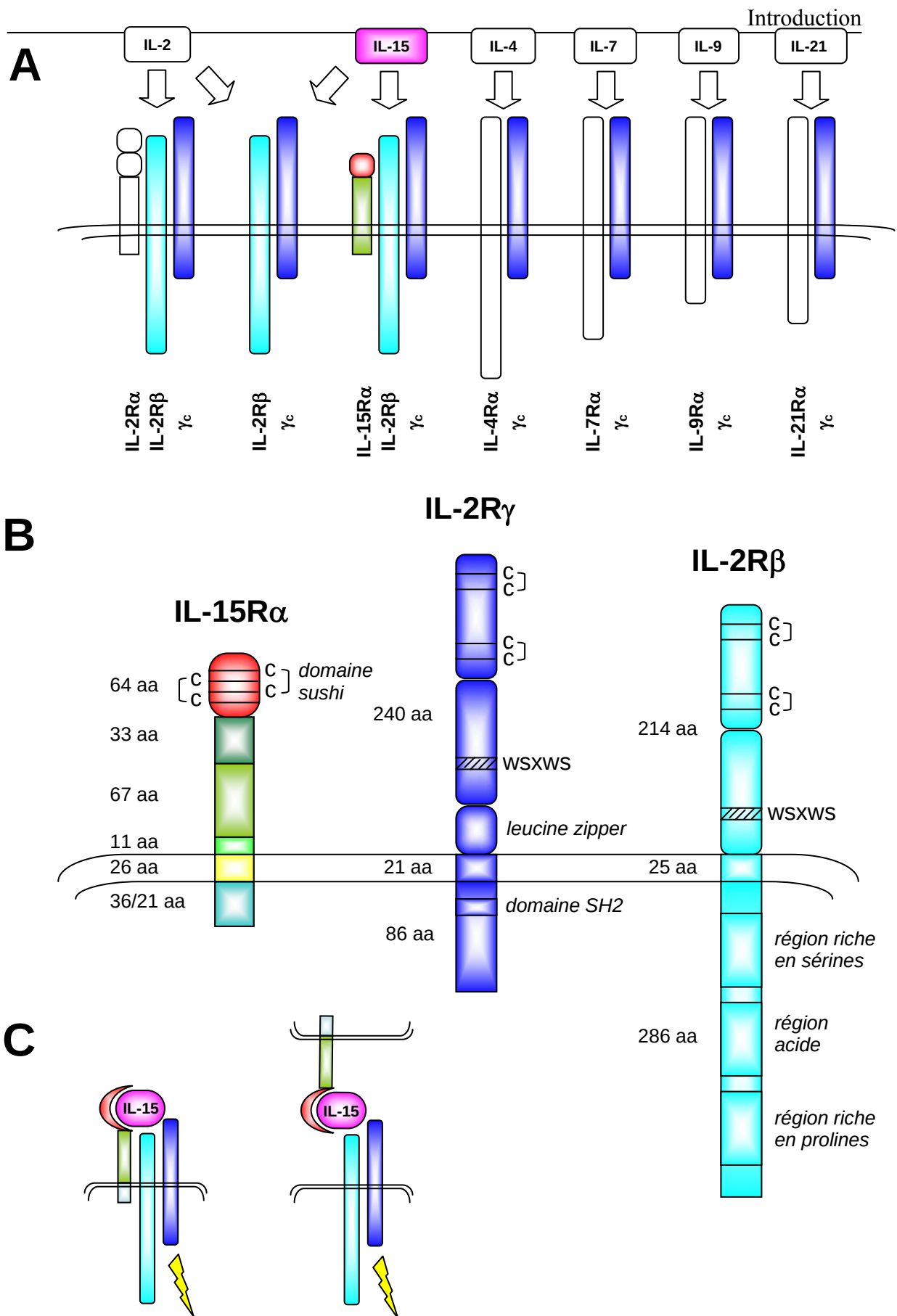


Figure 4 : Récepteurs Fonctionnels des Cytokines Hématopoïétiques et Transprésentation.
A. Récepteurs Fonctionnels des Cytokines Hématopoïétiques. **B.** Les Chaînes Réceptrices de l'IL-15. **C.** Présentation de l'IL-15 « Classique » et Transprésentation.

B. La chaîne privée du récepteur de l'IL-15 : l'IL-15R α .

La chaîne IL-15R α a été identifiée grâce aux observations faites montrant que l'IL-15 se fixe, avec une forte affinité, sur une lignée lymphocytaire B n'exprimant pas la chaîne γ_c , sans engendrer d'internalisation (Giri *et al.* 1994; Kumaki *et al.* 1995).

1. Identification et clonage de la chaîne IL-15R α .

La chaîne IL-15R α a été clonée préalablement chez la souris (Giri *et al.* 1995), en étudiant la fixation de l'IL-15 radiomiqué sur des cellules COS-7 transfectées par une banque d'ADN complémentaires (ADNc) issue du clone T murin D10, retenu pour sa réponse à l'IL-15. L'ADNc murin isolé a ensuite servi de sonde afin de cloner la chaîne IL-15R α humaine (Anderson *et al.* 1995). Deux banques d'ADNc de deux lignées humaines présentant un nombre important de sites de fixation de haute affinité pour l'IL-15 : les lignées WI-26VA4 (lignée épithéliale pulmonaire transformée par le virus SV40) et A172 (glioblastome) ont, ainsi, été criblées et permis l'identification de la chaîne IL-15R α humaine.

2. Caractéristiques du gène et des messagers de l'IL-15R α .

Le gène de l'IL-15R α est situé sur le chromosome 10 humain en position q14-15 (Anderson *et al.* 1995) (chromosome 2 chez la souris). Le gène est organisé en 7 exons et 6 introns. Les localisations chromosomiques des gènes humains de l'IL-15R α et IL-2R α sont proches et suggèrent une origine commune. Différents messagers de l'IL-15R α ont été mis en évidence. Ainsi, plusieurs isoformes ont été identifiées issues d'épissages alternatifs du gène codant pour la chaîne α du récepteur de l'IL-15. Un épissage alternatif au niveau de l'exon 7 du gène entraîne l'insertion d'une région génique en amont de l'exon 7 des ARNm. La forme longue de l'exon 7 obtenue est appelée exon 7'. Les différents transcrits sont issus de la combinaison de différentes délétions (Δ) des exons ainsi que de l'expression

différentielle de l'exon 7 ou 7'. Lors du clonage de la chaîne humaine, trois isoformes de messagers ont été découverts: IL-15R α (7), IL-15R α (7'), IL-15R $\alpha\Delta$ 3(7) (Anderson *et al.* 1995). Depuis, différentes isoformes supplémentaires ont été détectées dans divers tissus et lignées cellulaires: IL-15R $\alpha\Delta$ 3(7'), IL-15R $\alpha\Delta$ 2(7), IL-15R $\alpha\Delta$ 2(7'), IL-15R $\alpha\Delta$ 2/3(7) et IL-15R $\alpha\Delta$ 2/3(7') (Dubois *et al.* 1999). Les dernières isoformes ont été mise en évidence dans des mastocytes murins: IL-15R $\alpha\Delta$ 4(7), IL-15R $\alpha\Delta$ 3/4(7) et IL-15R $\alpha\Delta$ 3/4/5(7) (Bulanova *et al.* 2003). Les exons 2 à 5 codent pour le domaine extracellulaire, le 6 pour la partie transmembranaire, et les exons 7 ou 7' pour la partie intracytoplasmique. Ainsi, ces différentes isoformes de messagers codent pour des chaînes IL-15R α différentes (**Figure 5**).

3. Caractéristiques protéiques de l'IL-15R α .

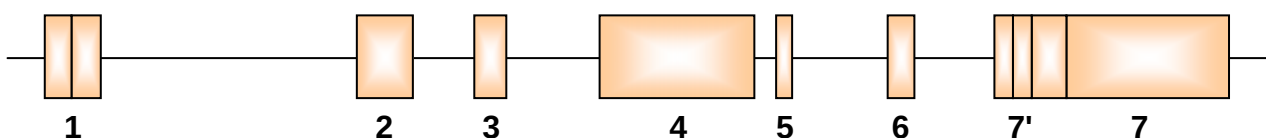
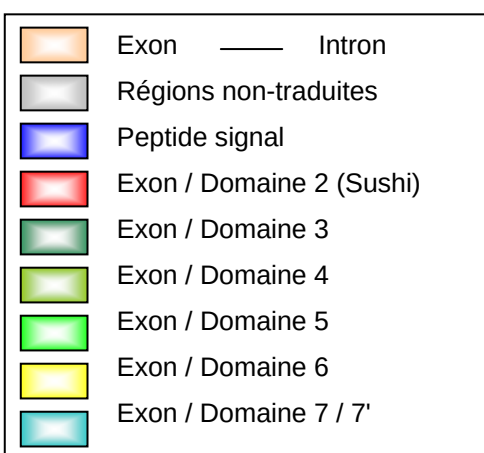
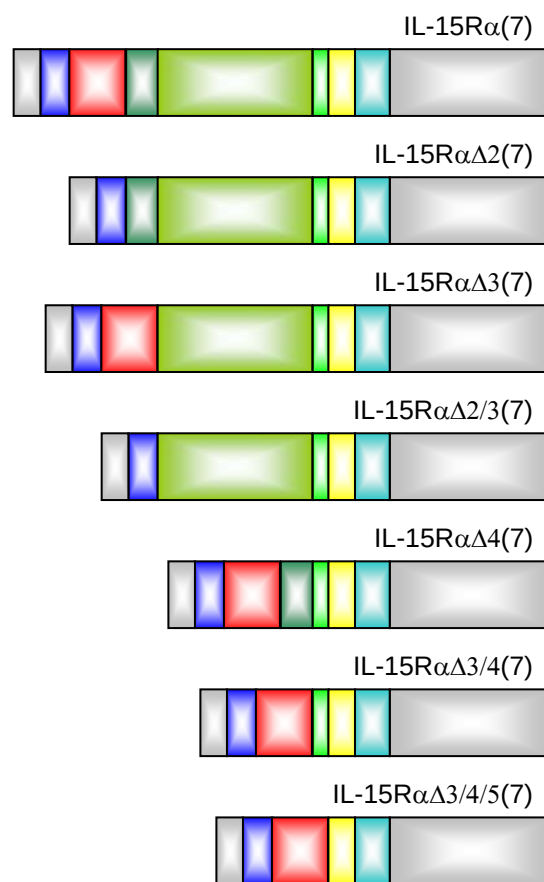
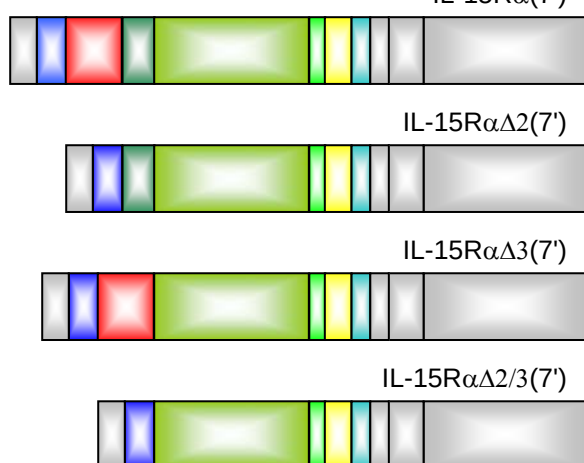
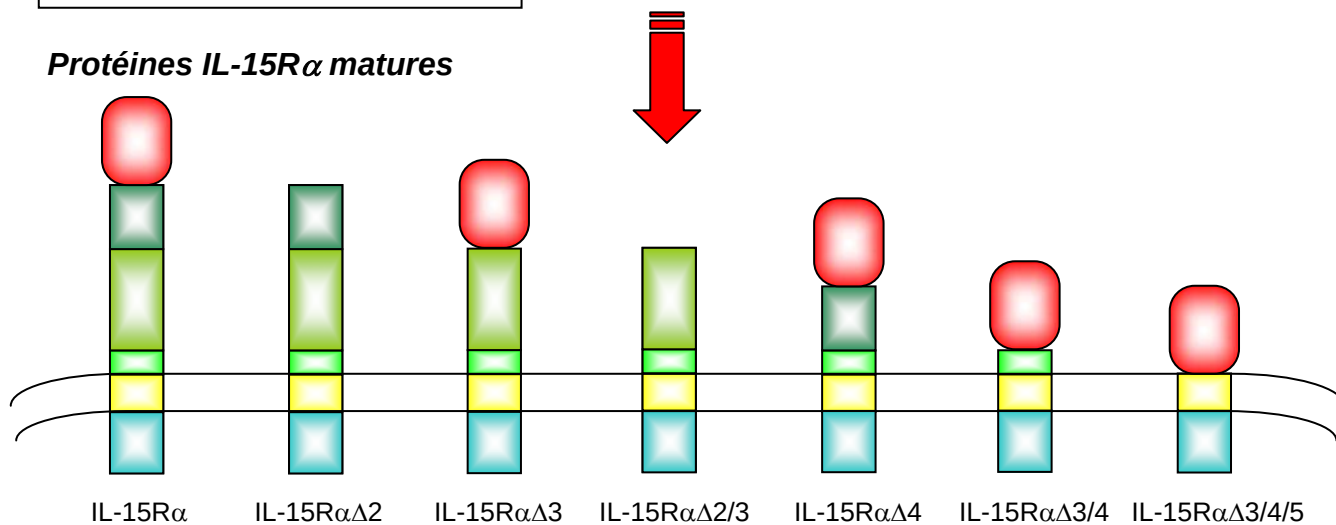
Le précurseur protéique de la forme totale de l'IL-15R α , codé par les exons de 1 à 7, est constitué de 267 aa et le peptide signal comprend 32 aa. C'est une protéine membranaire de 55- 60 kDa. Elle possède des homologies structurales avec la chaîne α du récepteur de l'IL-2.

Le domaine extracellulaire de 173 aa possède un motif caractéristique commun avec le récepteur de l'IL-2, impliqué dans les liaisons de protéines. Ce domaine porte le nom de domaine Sushi, encore appelé Src ("Short consensus repeat") ou GP-1 (glycoprotéine-1) (Giri *et al.* 1995). Le domaine Sushi a initialement été mis en évidence au niveau de protéines du complément (C1s, C1r, facteurs B et H) ou de facteurs de coagulation (facteur XIII et C4BP) (Davie *et al.* 1986; Perkins *et al.* 1988). C'est un domaine codé par l'exon 2 situé en N-terminal de la partie extracellulaire (aa 1 à 64). Il forme une structure globulaire formée par deux ponts disulfures intracaténaux imbriqués C3-C45 / C29-C63 et ne porte pas de glycosylation. Le domaine sushi dans sa forme soluble est capable de fixer l'IL-15 (Wei *et al.* 2001), par contre, les isoformes de l'IL-15R α dépourvus de ce domaine sushi sont incapables de lier l'IL-15 (Dubois *et al.* 1999). Les autres isoformes fixent l'IL-15 avec des affinités équivalentes, qu'elles expriment ou non les domaines 3, 4 ou 5 (Dubois *et al.* 1999; Bulanova *et al.* 2003). L'IL-15R α présente un seul domaine sushi alors que l'IL-2R α en présente deux. Ces deux chaînes forment une nouvelle famille de chaîne réceptrice grâce à leur domaine sushi.

La partie extracellulaire de la chaîne présente un seul site de N-glycosylation (Anderson *et al.* 1995). Mais la différence de masse moléculaire entre celle estimée par pontage covalent de l'IL-15 radiomarkée (55-60 kDa) et la masse théorique (35 kDa) laisse présager de l'existence de site de O-glycosylations par l'intermédiaire de résidus sérines et thréonines (Giri *et al.* 1995). Dans le cas de la chaîne IL-15R α humaine, les N-glycosylations augmentent de 3 kDa la masse moléculaire, et les O-glycosylations de 20 kDa (Dubois *et al.* 1999). Le domaine codé par l'exon 2 ne contient pas de site de glycosylation. Pour la chaîne IL-15R α murine, les O-glycosylations seraient toutes localisées dans le domaine 4 (Bulanova *et al.* 2003).

Le domaine transmembranaire de la chaîne α est constitué de 21 aa. La partie intracellulaire comporte, soit 41 aa si la région est codée par l'exon 7, soit 26 aa si l'exon 7' est impliqué. Ce domaine ne semble pas être impliqué dans la transduction du signal de prolifération cellulaire induite par l'IL-15 (Anderson *et al.* 1995) (**Figure 4B**).

Une forme soluble de l'IL-15R α issu d'un clivage protéolytique dépendant de TACE à partir de la forme membranaire a été mise en évidence récemment chez la souris (Budagian *et al.* 2004). Parallèlement, une partie de mon travail de thèse a permis de mettre en évidence une forme soluble de l'IL-15R α , également issue d'une coupure protéolytique (Mortier *et al.* 2004).

Gène de la chaîne IL-15R α humaine**Transcription****ARNm de l'IL-15R α** **Traduction****Protéines IL-15R α matures****Figure 5 : Gène, Transcription et Traduction de la Chaîne IL-15R α .**

4. Sites d'expression de l'IL-15R α .

Les ARNm codant pour la chaîne IL-15R α ont été mis en évidence dans un grand nombre de tissus et de lignées cellulaires. Ils ont été détectés dans le foie, le coeur, la rate, l'ovaire, l'intestin grêle, le colon et, également dans différents tissus foetaux comme l'épithélium pigmentaire rétinien, la microglie, le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe et le thalamus (Kumaki *et al.* 1996; Hanisch *et al.* 1997; Kurowska *et al.* 2002). Les transcrits de l'IL-15R α ont été détectés aussi dans les fibroblastes dermiques, les lymphocytes T et les monocytes du sang périphérique (Anderson *et al.* 1995), les cellules endothéliales vasculaires (Angiolillo *et al.* 1997), les cellules NK (Carson *et al.* 1997), les neutrophiles (McDonald *et al.* 1998) et les cellules dendritiques spléniques (Mattei *et al.* 2001). Les ARNm de l'IL-15R α présentent une large distribution tissulaire et cellulaire, ce qui témoigne d'un spectre d'action très large.

5. Régulation de l'expression de l'IL-15R α .

L'expression des ARNm de l'IL-15R α est faible dans les lymphocytes T au repos mais est augmentée après stimulation par l'IL-2, un anticorps anti-CD3, ou le PMA. L'IFN γ augmente le taux d'ARNm de l'IL-15R α dans les macrophages (Giri *et al.* 1995). Les cellules dendritiques voient leur taux d'ARNm augmenté suite à une activation par les IFN $\alpha\beta$ ou le LPS (Mattei *et al.* 2001). Le dexaméthasone, quant à lui, diminue l'expression des transcrits de l'IL-15R α . L'IL-15 induit une diminution rapide de l'expression membranaire de la chaîne IL-15R α dans les lymphocytes T et B activés (Kumaki *et al.* 1996). De plus, l'activité transcriptionnelle du gène de l'IL-15R α pourrait être contrôlée par NF- κ B et IRF-4 (Mariner *et al.* 2001; Mariner *et al.* 2002).

Toutes les isoformes décrites peuvent s'exprimer à la membrane des cellules (Anderson *et al.* 1995; Dubois *et al.* 1999; Bulanova *et al.* 2003) (**Figure 5**). Les isoformes dépourvues du domaine sushi sembleraient, quant à elles, fortement être localisées au niveau perinucléaire (Dubois *et al.* 1999; Bulanova *et al.* 2003). Une expression intranucléaire de l'IL-15R α a été mise en évidence dans des lignées de mélanomes humains (Pereno *et al.* 2000). La translocation intranucléaire de l'IL-15R α pourrait

s'expliquer par la présence d'une séquence NLS potentielle et conservée dans les domaines sushi humain et murin (Dubois *et al.* 1999).

6. La chaîne réceptrice IL-15RX des mastocytes.

Cette chaîne a été mise en évidence dans des lignées mastocytaires murines proliférant en réponse à IL-15 mais pas à l'IL-2. Ces cellules n'expriment pas la chaîne IL-2R β et la surexpression de la chaîne γ_c n'intervient pas dans la prolifération induite par l'IL-15. L'IL-15 se fixe sur une protéine de 60-65 kDa à la surface des cellules, protéine dont la nature reste inconnue, nommée IL-15RX (Tagaya *et al.* 1996).

C. La transduction du signal IL-15.

1. Signalisation par le récepteur dimérique IL-2R β / γ_c et le récepteur trimérique IL-15R α / IL-2R β / γ_c .

Différentes expériences de transfection des chaînes IL-2R β et γ_c dans diverses cellules ont permis de définir le complexe IL-2R β / γ_c comme récepteur fonctionnel de l'IL-15 (Giri *et al.* 1994). Ce récepteur IL-2R β / γ_c , est capable de répondre à des concentrations en IL-15 de l'ordre du nanomolaire (Balasubramanian *et al.* 1995; de Jong *et al.* 1996). La chaîne spécifique IL-15R α peut s'associer avec les chaînes IL-2R β et γ_c pour former un complexe trimérique de haute affinité pour l'IL-15 (50 pM) (de Jong *et al.* 1996). Les signaux prolifératifs induits par ces deux complexes sont identiques et mettent en jeu principalement les JAKs, les STATs, les MAPKs et la PI3-K (**Figure 6**).

a) Les kinases JAK1 et JAK3.

Ces JAK sont respectivement couplées aux chaînes IL-2R β et γ_c dans les lymphocytes T (Johnston *et al.* 1994; Johnston *et al.* 1995), mais JAK3 peut aussi se lier à IL-2R β (Russell *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1998). Après leur activation, JAK1 et JAK3 induisent la phosphorylation des tyrosines de IL-2R β . Ces JAK sont importantes pour la prolifération et la différenciation des lymphocytes (Cao *et al.* 1995; Nosaka *et al.* 1995; Thomis *et al.* 1995; Rodig *et al.* 1998).

b) Les facteurs STAT3 et STAT5.

STAT3 et STAT5 se fixent sur les phosphotyrosines (Y392 et Y510) de la chaîne IL-2R β . Cela engendre la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT5 dans les lymphocytes T au repos, ou de STAT3 et STAT5 dans les lymphocytes T activés (Johnston *et al.* 1995; Lin *et al.* 1995). STAT3 serait impliqué dans le cycle cellulaire et dans la régulation de l'apoptose (Takeda *et al.* 1998; Catlett-Falcone *et al.* 1999). STAT5 n'aurait pas d'influence sur le cycle cellulaire mais semble nécessaire à la protection anti-apoptotique (Zamorano *et al.* 1998). STAT5 est plus (Goldsmith *et al.* 1995) ou moins (Fujii *et al.* 1995) impliqué dans la prolifération cellulaire suivant le modèle étudié.

c) Les MAPKs ERK1, JNK et p38 MAPK.

Cette activation met en jeu JAK1 qui phosphoryle Y338 de l'IL-2R β (Friedmann *et al.* 1996). Cela permet le recrutement et la phosphorylation de la protéine adaptatrice shc. La shc phosphorylée s'associe à Grb-2 et Sos, et active les MAPKs (Ravichandran and Burakoff 1994).

La Y338 de l'IL-2R β permet aussi le recrutement et la phosphorylation de Gab2 par JAK3 (Gadina *et al.* 2000). La protéine Gab2 activée associée à SHP2 et à la PI3-K pourrait former un complexe avec Shc/Grb-2/Sos et activer les MAPKs (Gadina *et al.* 1999).

JAK3 activerait Pyk2 ("Proline-rich tyrosine kinase 2") (Miyazaki *et al.* 1998), indépendamment des STAT. Cela induirait l'activation de ERK1-2 (Dikic *et al.* 1996) et JNK (Tokiwa *et al.* 1996).

d) La PI3-K.

Le recrutement et la phosphorylation de la PI3-K mettent en jeu l'IL-2R β (Kanazawa *et al.* 1994), JAK1 (Migone *et al.* 1998), et les kinases Lck (Taichman *et al.* 1993) et Fyn (Karnitz *et al.* 1994). La PI3-K induit la prolifération cellulaire (Karnitz *et al.* 1995), active la biosynthèse protéique (Reif *et al.* 1997), et active la kinase anti-apoptique Akt (Ahmed *et al.* 1997).

2. Signalisation par l'IL-15R α .

La chaîne IL-15R α a longtemps été décrite comme étant dépourvue d'activité transductrice (Giri *et al.* 1995). Depuis, des études plus récentes ont montré que cette chaîne pouvait avoir une activité anti-apoptotique, en activant TRAF2 ("TNF-R Associated Factor 2") ou Syk ("Spleen tyrosine kinase").

Dans la lignée fibroblastique murine L929, n'exprimant que la chaîne IL-15R α sans les chaînes de transduction du signal IL-2R β et γ_c , la fixation de l'IL-15 sur sa chaîne spécifique entraîne le recrutement de TRAF2 (Bulfone-Pau *et al.* 1999). En effet, la partie intracytoplasmique de l'IL-15R α , présente des homologies de séquence avec les motifs de fixation de TRAF2 retrouvées également pour CD40 et CD30. Ainsi captée, TRAF2 ne peut plus se fixer à TNF-R1 et s'associer à ses partenaires pour former le complexe de mort TRAF2/FADD/TRADD/RIP. En présence d'IL-15, le TNF-R1 n'active plus la voie pro-apoptotique des caspases, mais le complexe IL-15/ IL-15R α /TRAF2 active plutôt la voie anti-apoptotique NIK/IKK/NF- κ B. L'IL-15 protège donc de l'apoptose induite par le TNF α et active la voie NF- κ B. L'activation de NF- κ B par l'IL-15 a aussi été mise en évidence dans les neutrophiles (McDonald *et al.* 1998), les précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ humains, dans des lignées leucémiques (Giron-Michel *et al.* 2003) et de mélanomes (Pereno *et al.* 2000) (**Figure 6**).

Le recrutement de Syk par la chaîne IL-15R α se fait en réponse à l'IL-15 dans les lignées humaines lymphocytaires B (Bulanova *et al.* 2001). La kinase Syk activée phosphoryle l'IL-15R α et la Phospholipase C γ (PLC γ). Dans ces lignées lymphocytaires B, la chaîne IL-15R α isolée en réponse à l'IL-15, entraîne une réponse cellulaire et une protection contre l'apoptose induite par le C2-céramide (**Figure 6**).

3. Signalisation dans les mastocytes.

Les mastocytes prolifèrent en réponse à l'IL-15 par l'intermédiaire de la chaîne IL-15RX en l'absence de l'IL-2R β et indépendamment de γ_c (Tagaya *et al.* 1996). La signalisation par la chaîne IL-15RX passe par JAK2/STAT5 (Tagaya *et al.* 1996) et Tyk2/STAT6 (Masuda *et al.* 2000). Le facteur STAT6, en réponse à l'IL-15, est essentiel

aux mastocytes pour la production d'IL-4. De plus, il protège ces cellules contre l'apoptose en augmentant les ARNm de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL (Masuda *et al.* 2000).

Différentes isoformes de l'IL-15R α ont été mise en évidence dans les mastocytes: IL-15R $\alpha\Delta 4(7)$, IL-15R $\alpha\Delta 3/4(7)$ et IL-15R $\alpha\Delta 3/4/5(7)$. Suite à la liaison de l'IL-15, l'isoforme recrute et phosphoryle la tyrosine kinase Syk et induit la phosphorylation de JAK2 et STAT5. L'isoforme IL-15R $\alpha\Delta 3/4(7)$ induit en plus la phosphorylation de STAT3, alors que les deux autres isoformes recrutent STAT6 (Bulanova *et al.* 2003) (**Figure 6**).

4. Signalisation par le récepteur hybride IL-15R α /IL-2R β / β_c des cellules TF-1 β .

Une étude a montré que la chaîne β_c remplace la chaîne transductrice γ_c pour former un nouveau complexe récepteur hybride IL-15R α /IL-2R β / β_c fonctionnel pour l'IL-15. La chaîne β_c permettrait d'abolir les signaux spécifiques de la chaîne γ_c en réponse à l'IL-15, en particulier la voie JAK3/STAT5. Le partage des chaînes β_c et γ_c par l'IL-15 et GM-CSF bloquerait l'engagement vers la voie lymphoïde en favorisant la voie myéloïde lors de l'hématopoïèse (Giron-Michel *et al.* 2003) (**Figure 6**).

5. Signalisation par le récepteur IL-15R α des cellules TF-1 et TF-1 β .

Dans la lignée erythroleucémique TF-1 et les cellules TF-1 β , la chaîne γ_c est colocalisée avec l'IL-15R α . De plus, l'immunoprécipitation de TRAF2 entraîne la coprécipitation des chaînes IL-15R α et γ_c . La stimulation du complexe IL-15R α / γ_c /TRAF2 par l'IL-15 active NF-KB. La stimulation par l'IL-15 en présence d'un anticorps anti- β_c , du complexe IL-15R α / γ_c /TRAF2 provoque la phosphorylation d'une protéine de 90 kDa précipitable par un anticorps anti-JAK3 (Giron-Michel *et al.* 2003) (**Figure 6**).

Récepteurs Conventionnels de l'IL-15

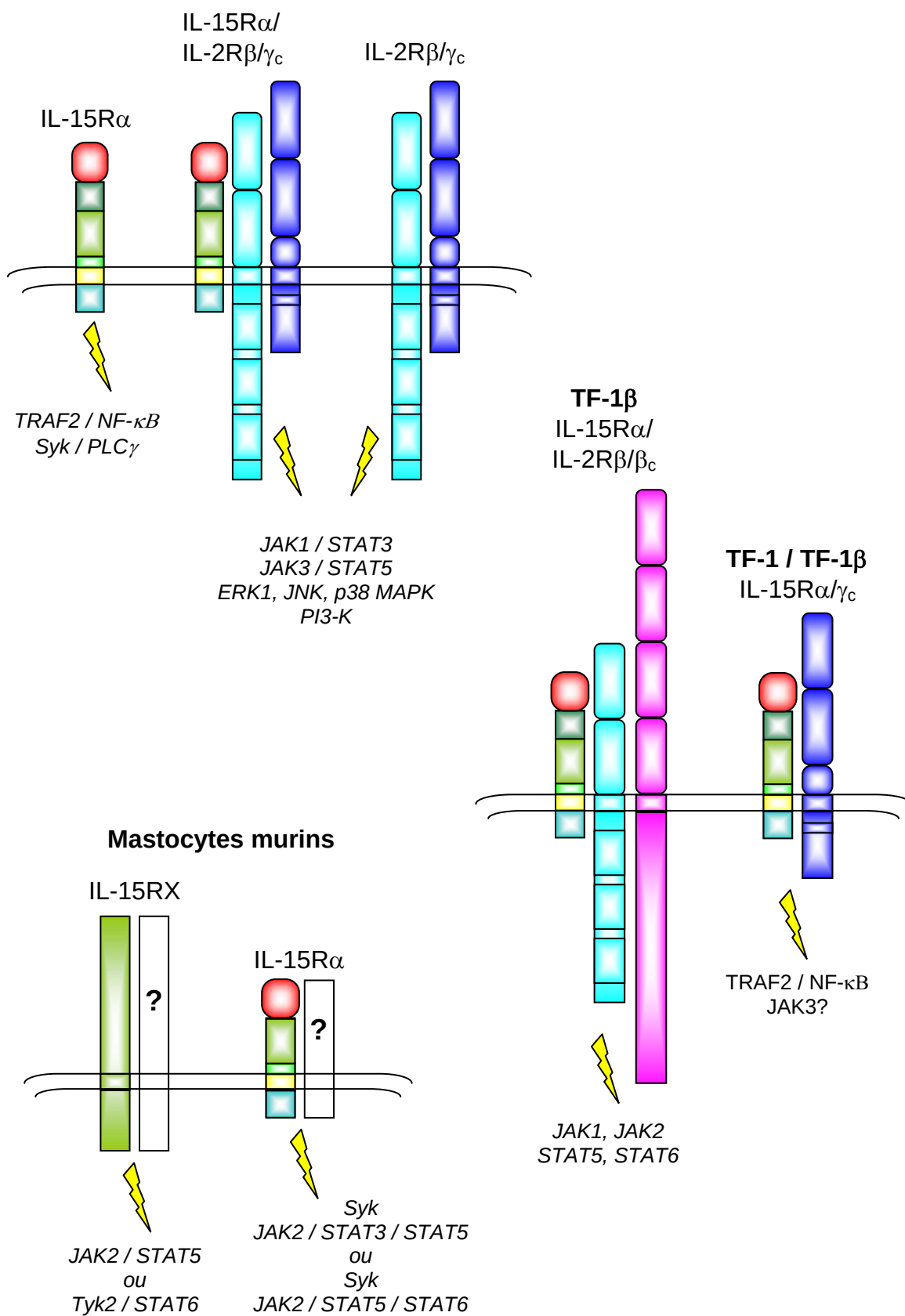


Figure 6 : Récepteurs Fonctionnels de l'IL-15.

III. Les Fonctions Biologiques de l'IL-15.

Les redondances fonctionnelles entre l'IL-15 et l'IL-2 s'expliquent par l'utilisation de chaînes transductrices communes. Cependant, l'IL-15 et sa chaîne réceptrice spécifique IL-15R α se retrouvent exprimées dans de nombreux types tissulaires et cellulaires, alors que l'expression de l'IL-2 est restreinte aux lymphocytes T activés. L'IL-15 exerce, ainsi, des activités biologiques variées.

A. Les fonctions biologiques de l'IL-15 dans le système immunitaire.

1. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques.

Les monocytes constituent une des principales sources d'IL-15 de l'organisme (Grabstein *et al.* 1994). Les monocytes expriment à leur surface le récepteur de haute affinité IL-15R α (Anderson *et al.* 1995), IL-2R β (Espinoza-Delgado *et al.* 1990) et γ_c (Bosco *et al.* 1994). Les monocytes sécrètent de l'IL-15 en réponse à une activation (Doherty *et al.* 1996). Les monocytes produisent l'IL-8 et du MCP-1 en réponse à l'IL-15 (Badolato *et al.* 1997). L'IL-8 exerce un effet chimioattractant sur les neutrophiles et le MCP-1 attire les monocytes. L'activation des monocytes par une boucle autocrine d'IL-15 favorise l'expression de CD40 membranaire (Avicé *et al.* 1998). Le CD40 des monocytes interagit alors avec le CD40L des lymphocytes, ce qui active les monocytes à sécréter de l'IL-12. L'IL-12 est impliquée dans la protection contre les infections et dans la réponse inflammatoire. De plus, l'IL-15 et l'IL-15R α sont impliqués dans la différenciation des monocytes en cellules dendritiques en combinaison avec le GM-CSF (Mohamadzadeh *et al.* 2001; Saikh *et al.* 2001).

Les macrophages sécrètent l'IL-15 et expriment les trois chaînes réceptrices de l'IL-15. La réponse de ces cellules apparaît dépendre de la concentration d'IL-15 utilisée. En effet de faibles doses d'IL-15 (10^{-12} à 10^{-15} M) inhibent la production du TNF α , de l'IL-1 et de l'IL-6. Au contraire, des doses plus fortes d'IL-15 augmentent la production de ces cytokines (Alleva *et al.* 1997). L'IL-15 induit également l'expression de la chaîne IL-

12R β 1 augmentant le nombre de sites pour l'IL-12 (Wu *et al.* 1997). L'IL-15 et l'IL-15R α sont essentiels à la production d'IFN γ médié par l'IL-12 (Ohteki *et al.* 2001).

Les cellules dendritiques expriment les transcrits de l'IL-15 (Jonuleit *et al.* 1997) et de l'IL-15R α (Mattei *et al.* 2001). La sécrétion d'IL-15 est activée par l'activité phagocytaire de ces cellules (Jonuleit *et al.* 1997), par le CD40L (Kuniyoshi *et al.* 1999), le LPS et les IFN $\alpha\beta$ (Mattei *et al.* 2001). La transcription du gène de l'IL-15R α est augmentée par le LPS et les IFN $\alpha\beta$ (Mattei *et al.* 2001). La sécrétion d'IFN γ par les cellules dendritiques est activée par une boucle d'IL-15. L'IL-15 retarde, aussi, l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-x_L, en bloquant l'inhibition de Bcl-2 et en augmentant l'expression de l'IL-15R α (Pirtskhalaishvili *et al.* 2000). Enfin, l'IL-15 produite par les cellules dendritiques exerce un pouvoir chimioattractant (Jonuleit *et al.* 1997) et un effet activateur sur les lymphocytes T (Mattei *et al.* 2001).

2. Les lymphocytes T.

a) Les lymphocytes T à TCR $\alpha\beta$.

(1) L'homéostasie des lymphocytes T.

L'importance du système IL-15 dans l'établissement de lymphocytes T CD8 mémoires dans la rate, les ganglions lymphatiques (Kennedy *et al.* 2000), le thymus et la périphérie (Lodolce *et al.* 1998), a été démontrée suite à des expériences d'inactivation génique de l'IL-15 ou de l'IL-15R α . L'IL-15 ne semble pas intervenir dans le développement mais plutôt dans la prolifération et la survie des lymphocytes.

(2) La prolifération de lymphocytes T.

L'IL-15 induit la prolifération de différents lymphocytes T: mémoires CD45RO⁺CD4⁺, CD45RO⁺CD8⁺ et CD44^{high}CD8⁺ et naïfs CD45RO⁻CD8⁺ mais pas des CD45RO⁻CD4⁺ (Kanegane and Tosato 1996). La prolifération *in vivo* des cellules CD44^{high}CD8⁺ mettrait en jeu la stimulation *trans*-cellulaire de l'IL-15 sur sa chaîne IL-15R α (Burkett *et al.* 2003). Enfin, l'IL-15 permettrait d'augmenter la capacité proliférative des lymphocytes T régulateurs/suppresseurs CD4⁺CD25^{high} de type Tr1 (Roncarolo *et al.* 2001; Bacchetta *et al.* 2002).

(3) La survie des lymphocytes T.

L'IL-15 protège les lymphocytes T activés de l'apoptose induite par un anticorps anti-Fas (Bulfone-Paus *et al.* 1997). Au contraire, l'IL-2 provoque une réponse AICD ("Activation-Induced Cell Death") sur les lymphocytes T en prolifération en diminuant l'expression de Bcl-2 par régulation négative de la chaîne γ_c (Li *et al.* 2001).

(4) La migration des lymphocytes T.

L'IL-15 exerce un effet chimioattractant sur les lymphocytes T activés ou au repos (Wilkinson and Liew 1995). L'IL-15 entraîne la formation d'uropodes sur les lymphocytes T qui vont interagir avec ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD43 et CD44 (Nieto *et al.* 1996). Ce processus met en jeu l'intégrine LFA-1 (Oppenheimer-Marks *et al.* 1998; Sancho *et al.* 1999) présent sur les lymphocytes T et la molécule d'adhésion ICAM-1 des cellules endothéliales (Sancho *et al.* 1999). Cependant, ce phénomène apparaît plus complexe. En effet, l'inactivation du gène de l'IL-15R α provoque l'expression membranaire des molécules LFA-1 et CD44 (Lodolce *et al.* 1998).

(5) L'activation des lymphocytes T.

Au repos les lymphocytes T ne répondent pas à l'IL-15 mais l'activation par le TCR entraîne l'expression membranaire de l'IL-15R α . L'IL-15 permet l'expression de divers marqueurs à la surface des lymphocytes T: IL-2R α (CD25) (Kumaki *et al.* 1996), Fas (CD95), CD30, TNF-R2, CD40L (CD154), CD69 (Kanegane and Tosato 1996) et CD94/NKG2-A (Mingari *et al.* 1998). L'IL-15 induirait l'initiation de la prolifération dépendante de l'IL-2 en augmentant l'expression de la chaîne IL-2R α , favorisant ainsi, le développement de la réponse immunitaire des lymphocytes T activées par le TCR (Lodolce *et al.* 1998). Enfin, l'IL-15 diminue l'expression du CD27 (Bulfone-Paus *et al.* 1997), et de sa chaîne IL-15R α (Kumaki *et al.* 1996) à la surface de ces cellules.

(6) La sécrétion de cytokines par les lymphocytes T.

L'IL-15 induit principalement la sécrétion d'IFN γ et d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ activés (Borger *et al.* 1999), et d'IL-2 par les lymphocytes T activés (Bulfone-Paus *et al.* 1997). L'IL-15 agit en synergie avec l'IL-12 pour la sécrétion d'IFN γ par les cellules T CD4⁺ non activées (Seder 1996; Avice *et al.* 1998). L'IL-15 entraîne la sécrétion de différentes chimiokines de type CC (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) et la transcription de

récepteurs de chimiokines de type CCR (CCR-1, 2, 4 et 5) par les lymphocytes T (Perera *et al.* 1999). L'IL-15 semble donc impliquée plutôt vers la réponse immunitaire de type Th1. Cependant, l'IL-15 induirait également la prolifération des lymphocytes régulateurs de type Tr1. Les sécrétions d'IL-10 et de TGF β par ces cellules interviennent dans l'immunosuppression des réponses mémoires et naïves de type Th1 ou Th2 (Roncarolo *et al.* 2001; Bacchetta *et al.* 2002).

b) Les IELs.

Les IELs sont des lymphocytes intra-épithéliaux localisés au niveau de l'intestin, impliqués dans l'immunité des muqueuses. Les IELs exprimant le TCR $\alpha\beta$ présentent les chaînes α et β du CD8 ou un homodimère CD8 $\alpha\alpha$, ou sont CD4⁺. Les IELs TCR $\gamma\delta$ sont tous CD8 $\alpha\alpha$. Les messagers de l'IL-15 sont exprimés par l'épithélium intestinal foetal (Murray *et al.* 1998) et pourraient constituer une source d'IL-15 qui est un facteur essentiel à l'établissement des IELs CD8 $\alpha\alpha$ (Lodolce *et al.* 1998; Kennedy *et al.* 2000).

Les IELs TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ sont les seuls IELs affectés par l'inactivation du gène de l'IL-15 (Kennedy *et al.* 2000). Après stimulation antigénique, l'IL-15 serait impliquée dans la survie et l'expansion de ces cellules. En absence d'antigène, l'IL-15 agit sur la survie des IELs TCR $\alpha\beta$ (Lai *et al.* 1999).

L'IL-15 protège les IELs TCR $\gamma\delta$ contre l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-2 (Inagaki-Ohara *et al.* 1997) et en stabilisant la quantité de Bcl-x_L (Chu *et al.* 1999). De plus l'IL-15 active la production d'IFN γ par ces cellules et stimule leur cytotoxicité (Ebert 1998).

c) Les lymphocytes T à TCR $\gamma\delta$.

Les DETC ("Dendritic Epidermal T Cell") sont des lymphocytes T dendritiques épidermiques à TCR $\gamma\delta$. Ils assurent en partie la défense de l'épiderme contre les infections bactériennes, les tumeurs et les attaques auto-immunes. Ce sont des CPA qui migrent au niveau de la peau au stade foetal. L'IL-15 a été détectée au niveau de l'épiderme foetal où sont présents les DETC (Lodolce *et al.* 1998; Kennedy *et al.* 2000). Des expériences ont montré que les souris IL-2^{-/-} ne présentent pas de déficit en DETC contrairement au souris IL-2R β ^{-/-} (Kanai *et al.* 1996) ou γc ^{-/-} (Cao *et al.* 1995). De plus, les DETC prolifèrent en

réponse à l'IL-15 (Edelbaum *et al.* 1995) et cette cytokine pourrait être impliquée dans la survie après activation. Ces observations suggèrent l'importance de l'IL-15 dans le développement et la localisation épidermique des DETC.

d) Les cellules NK-T.

Les cellules NK-T expriment simultanément le TCR $\alpha\beta$ des cellules T et le marqueur NK1.1 des cellules NK. L'IL-15 est importante pour l'expansion, la maturation fonctionnelle et la survie des cellules NK-T, mais pas à leur développement (Kennedy *et al.* 2000). De plus, l'IL-15 permet aux cellules NK-T de proliférer (Ohteki *et al.* 1997) et de sécréter de l'IFN γ (Ohkawa *et al.* 2001).

3. Les lymphocytes B.

Le développement des lymphocytes B est indépendant de l'IL-15. Cependant, les souris IL-15R $\alpha^{-/-}$ présentent un défaut de prolifération et de migration vers les ganglions lymphatiques de la population B (Lodolce *et al.* 1998). En effet, l'IL-15 assure la prolifération des lymphocytes B préactivés. De plus, l'IL-15 en synergie avec le CD40L stimule la synthèse d'IgM, IgG1 et d'IgA (Armitage *et al.* 1995). Enfin, l'IL-15 favorise l'expression membranaire de la chaîne IL-2R α tout en diminuant celle de l'IL-15R α (Kumaki *et al.* 1996).

4. Les cellules NK.

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux ou LGL ("Large Granular Lymphocytes") qui jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée. Les cellules NK possèdent une activité tueuse naturelle ou NK ("Natural Killing"), une fonction tueuse activée par les lymphokines ou LAK ("Lymphokine-Activated Killing") et une cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC ("Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity"). En effet, les NK présentent une activité cytotoxique contre les cellules tumorales, les cellules infectées par des virus, et différents agents pathogènes. La cytotoxicité des cellules NK ainsi que leur sécrétion cytokinique sont augmentées par l'IL-15.

a) Le développement des cellules NK.

Le développement des cellules NK à partir des cellules souches hématopoïétiques nécessite entre autre l'IL-15 (Yu *et al.* 1998) produite par les cellules stromales (Puzanov *et al.* 1996) au sein de la moelle osseuse. Les cellules stromales produisent également SCF et Flt-3L nécessaires pour que les précurseurs hématopoïétiques $CD34^+$ s'engagent dans la voie de différenciation NK. Les précurseurs NK $CD34^{high}CD56^-$ expriment à leur surface IL-15R α et IL-2R β . L'IL-15 permet la différenciation en NK $CD56^+$. On distingue deux types de cellules NK circulantes $CD56^+$, les $CD56^{low}$ majoritairement représentées par rapport au $CD56^{high}$. La maturation finale des cellules NK en $CD56^+CD16^+$ est induite par l'IL-21 (Parrish-Novak *et al.* 2000).

b) La migration de cellules NK.

L'IL-15 exerce un effet chimioattractant sur les cellules, et favorise leur adhésion dépendante de LFA-1 ("Leucocyte Function-associated Antigen-1") à l'endothélium vasculaire. Ce processus intervient dans le recrutement des cellules NK au niveau des tissus infectés (Allavena *et al.* 1997).

c) L'activation des cellules NK.

L'IL-15 induit l'effet cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules cibles par les fonctions NK et ADCC (Carson *et al.* 1994).

d) La prolifération des cellules NK.

Les cellules NK $CD56^{high}$, qui expriment les chaînes IL-2R α , IL-2R β et γ_c (Caligiuri *et al.* 1990) ainsi que les ARNm de la chaîne IL-15R α , prolifèrent mieux en IL-15, que les $CD56^{low}$ qui n'expriment que les chaînes IL-2R β et γ_c (Carson *et al.* 1994; Carson *et al.* 1997). De plus, de faibles concentrations d'IL-15, de l'ordre du picomolaire, prolonge la survie des cellules NK, en maintenant l'expression de Bcl-2 (Carson *et al.* 1997).

e) La sécrétion de cytokines par les cellules NK.

La co-stimulation par l'IL-15 et l'IL-12, produits notamment par les monocytes, induit les cellules NK à sécréter de l'IFN γ et du TNF α (Carson *et al.* 1994; Ross and

Caligiuri 1997; Fehniger *et al.* 1999). De plus, les cellules NK CD56^{high} en réponse à l'action synergique de l'IL-15 et de l'IL-12, produisent plus d'IFN γ (Carson *et al.* 1995), de TNF α et de GM-CSF, que les CD56^{low} (Fehniger *et al.* 1999). Les cellules NK produisent également du MIP-1 α et du MIP-1 β en réponse à l'IL-15. En synergie avec l'IL-12, ces productions sont accrues (Bluman *et al.* 1996; Fehniger *et al.* 1998; Fehniger *et al.* 1999). Ces chimiokines pourraient permettre la migration des cellules NK et des lymphocytes T et B vers le foyer inflammatoire.

5. Les éosinophiles.

L'IL-15 retarde l'apoptose par un processus mettant en jeu NF-KB et une boucle autocrine de GM-CSF, et donc prolonge leur survie (Hoontrakoon *et al.* 2002).

6. Les neutrophiles.

Les neutrophiles expriment les trois chaînes réceptrices de l'IL-15, IL-15R α , IL-2R β et γ_c . L'IL-15 induit sur ces cellules une augmentation de l'activité transcriptionnelle et traductionnelle. Elle augmente l'activité phagocytaire et provoque un changement morphologique en agissant sur le cytosquelette. De plus, la stimulation par l'IL-15 agit sur la sécrétion de différentes cytokines, dont l'IL-8, l'IL-1 β , l'IL-1ra (Jablonska *et al.* 2001) et l'IL-7 (Ferretti *et al.* 2003). Enfin, l'IL-15 retarde l'apoptose en maintenant l'expression de Mcl-1 ("Myeloïd cell leukemia sequence 1") (Pelletier *et al.* 2002) et active la voie NF-KB (Cassatella and McDonald 2000).

7. Les mastocytes.

Les mastocytes issus de la moelle osseuse prolifèrent en réponse à l'IL-15, par l'intermédiaire de la chaîne réceptrice IL-15RX (Tagaya *et al.* 1996). L'IL-15 augmente la production d'IL-4 et pourrait diriger la réponse immunitaire vers la voie Th2 (Masuda *et al.* 2000). De plus, l'IL-15 protège les mastocytes contre l'apoptose en agissant sur Bcl-x_L (Masuda *et al.* 2001).

B. Les fonctions biologiques de l'IL-15 en dehors du système immunitaire.

L'IL-15 agit sur différentes cellules n'appartenant pas au système immunitaire. L'IL-15 semble jouer un rôle dans la régulation de la formation des jonctions cellulaires de la barrière intestinale (Nishiyama *et al.* 2001). De plus les cellules épithéliales intestinales prolifèrent en réponse à l'IL-15. L'IL-15 active l'angiogénèse *in vivo* et protège les cellules endothéliales contre l'apoptose *in vitro*. L'IL-15 pourrait induire la différenciation des cellules musculaires et réguler positivement la quantité de protéines dans le muscle squelettique (Fehniger and Caligiuri 2001). L'IL-15 pourrait également participer dans la régulation des masses musculaire et adipeuse (Carbo *et al.* 2001). L'IL-15 semble aussi maturer les ostéoclastes et jouer un rôle dans la résorption osseuse (Ogata *et al.* 1999).

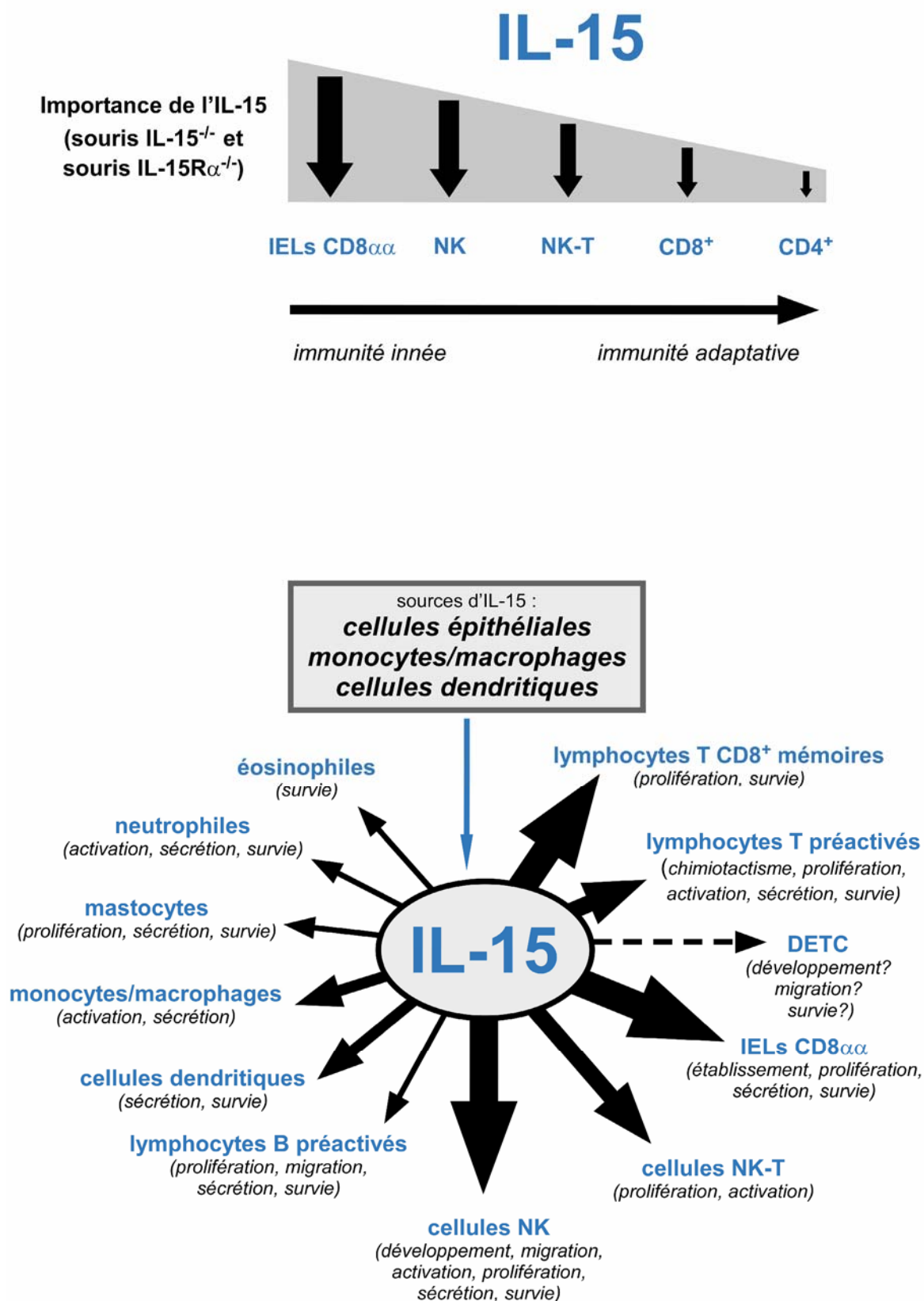


Figure 7 : Fonctions Physiologiques de l'IL-15 dans le Système Immunitaire (Bernard J., Thèse, 2003).

IV. Les fonctions de l'IL-15 dans un contexte pathologique.

A. Les infections virales.

1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : VIH.

Le rôle de l'IL-15 dans l'infection par le VIH est complexe car l'IL-15 exerce deux actions paradoxales pour les patients infectés. L'IL-15 active la réplication du virus tout en stimulant les fonctions immunitaires contre le virus (Fehniger and Caligiuri 2001; Mastroianni *et al.* 2004). En effet l'IL-15 restaure la fonction cytotoxique et la sécrétion d'IL-12 des cellules NK des patients (Chehimi *et al.* 1997; Lin *et al.* 1998). De plus, l'IL-15, en synergie avec l'IL-12, permet la production de différentes chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) par les cellules NK et inhibe l'infection *in vitro* (Fehniger *et al.* 1998). Ces chimiokines sont, aussi, sécrétées par les lymphocytes T CD8⁺ et bloquent le tropisme du VIH pour les monocytes/macrophages (Cocchi *et al.* 1995). De plus, ces chimiokines entrent en compétition de fixation avec la gp120 du VIH, et diminuent l'expression du récepteur CCR-5, impliqué dans l'entrée du virus dans les cellules (Samson *et al.* 1996; Dragic *et al.* 1998).

La production d'IL-15 est défectueuse chez les patients infectés par le VIH. Une forte expression d'IL-15 dans les sérums est corrélée avec une meilleure réponse à la thérapie (Amicosante *et al.* 2003). Une différence significative quant à la production d'IL-15 par les cellules mononuclées du sang en réponse à différents antigènes a été observée entre les patients non traités et ceux ayant un traitement antirétroviral HAART (d'Ettorre *et al.* 2002). Les cellules CD8⁺ spécifiques du VIH et les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse immunitaire pendant l'infection virale (Kottlilil *et al.* 2003). Chez les individus infectés par le VIH, le traitement *in vitro* par l'IL-15 active les fonctions des neutrophiles (Mastroianni *et al.* 2000), augmente la survie et la fonction des cellules NK (Naora and Gougeon 1999) et assure l'expansion des lymphocytes T spécifique du VIH (Fehniger *et al.* 2001). L'IL-15 est important pour maintenir le pool de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Mueller *et al.* 2003; Mueller *et al.* 2003). Ces cellules sont sensibles à l'apoptose induite par Fas (CD95). L'IL-15 augmente leur survie, par un mécanisme qui

ferait intervenir une augmentation du taux de Bcl-2 intracellulaire (Zaunders *et al.* 2003). L'IL-15 active, aussi, la survie à long terme et les fonctions effectrices des cellules T CD8⁺ spécifique du VIH en augmentant la cytotoxicité et la production d'IFN γ *ex vivo* (Mueller *et al.* 2003). Des études ont montré que l'IL-15 était la cytokine la plus efficace par rapport à l'IL-2 et l'IL-7, pour augmenter la réponse des cellules CD8⁺ spécifiques du gag-VIH. Ceci suggère que l'IL-15 pourrait être utilisé comme immunomodulateur dans des thérapies futures anti-VIH (Chitnis *et al.* 2003). L'IL-15, en synergie avec l'IL-21, semble réguler positivement la transcription du gène de l'IFN γ dans les cellules T et NK (Strengell *et al.* 2003). L'IL-15 doit avoir un rôle important dans la restauration de la réponse immunitaire en maintenant ou en régulant la production d'IFN γ par ces cellules. Grâce à ses effets à long terme sur l'immunité cellulaire, l'IL-15 peut être envisagée comme une cytokine adjuvante pour un futur vaccin contre le VIH. Il faut cependant être prudent quant aux effets préjudiciables de l'activation accrue du système immunitaire et de l'accélération de la sénescence immunitaire (Mastroianni *et al.* 2004).

2. Autres virus.

La transcription et la sécrétion d'IL-15 par les monocytes et les cellules NK est augmentée après infection *in vitro* de PBMC humains par le HHV-6 ("Human Herpes Virus typ-6"), HHV-7, HSV-1 ("Herpes Simplex Virus type-1") ou l'EBV ("Epstein-Barr Virus"). L'IL-15 limite ainsi l'expansion virale en activant la cytotoxicité et la sécrétion de l'IFN γ des cellules NK. Des observations *in vivo* ont montré une augmentation de la sécrétion d'IL-15 lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (Fehniger and Caligiuri 2001).

B. Les maladies inflammatoires.

1. La polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire affectant les jonctions osseuses périphériques, caractérisée par une hyperplasie de la membrane synoviale et par une infiltration de cellules immunitaires au niveau des liquides synoviaux. Au cours de cette maladie, on observe des taux élevés de cytokines proinflammatoires dans les fluides

articulaires. L'IL-15 est détectée dans les fluides synoviaux (McInnes *et al.* 1996; McInnes *et al.* 1997) et est exprimée par les cellules de la membrane synoviale chez les patients atteints de la forme active de la maladie (McInnes *et al.* 1996). La déplétion des lymphocytes CD4⁺ des liquides synoviaux diminue la sécrétion d'IL-15, d'IL-1 β et de TNF α par les cellules CD68⁺ macrophagiques synoviales. L'IL-15 est également produite par les synoviocytes de type fibroblastique (Harada *et al.* 1999) qui maintiennent ainsi leur taux d'expression de Bcl-2 et Bcl-x_L impliqués dans la survie cellulaire (Kurowska *et al.* 2002).

L'IL-15 des liquides synoviaux permet la migration des lymphocytes T vers les membranes synoviales ainsi que leur activation et la production de TNF α par ces cellules (McInnes *et al.* 1996; McInnes *et al.* 1997). De plus, le contact cellulaire, faisant intervenir ICAM-1, CD69 et LFA-1 (McInnes *et al.* 1997), entre les lymphocytes T synoviaux activés par l'IL-15 et les macrophages synoviaux induit les macrophages à produire du TNF α (Sebbag *et al.* 1997). L'IL-15 induit également l'expression du CD40L, par les lymphocytes T synoviaux (Mottonen *et al.* 2000), qui va interagir avec le CD40 des monocytes qui vont sécréter des cytokines de type Th1 (Avice *et al.* 1998). L'IL-15 provoque la sécrétion d'IL-17 qui est impliquée dans la résorption ostéoclastique par les PBMC lors de la maladie, l'IL-17 (Kotake *et al.* 1999; Ziolkowska *et al.* 2000).

Des résultats intéressants, quant au blocage de l'action de l'IL-15, ont été montrés lors de l'administration d'une forme soluble recombinante de la chaîne IL-15R α . En effet, le sIL-15R α bloque le développement de l'arthrite induite par le collagène, confortant le rôle important joué par l'IL-15 dans la maladie (Ruchatz *et al.* 1998).

2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin regroupent la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH), caractérisées par des désordres gastro-intestinaux et extra-intestinaux. On détecte un pourcentage de PBMC sécrétant de l'IL-15 plus élevé chez les patients atteints de RCH ou de la forme aiguë de la MC par rapport aux sujets sains ou aux patients atteints d'une forme plus modérée de la MC (Kirman and Nielsen 1996). L'IL-15 serait produite par les macrophages et les cellules épithéliales de la muqueuse rectale (Sakai *et al.* 1998; Liu *et al.* 2000). La surexpression d'IL-15 au niveau

de la *lamina propria* provoquerait une expansion locale des cellules NK-T participant à l'inflammation pathologique (Ohta *et al.* 2002). De plus, l'IL-15 de la muqueuse intestinale permet l'activation des lymphocytes T qui, par interaction CD40/CD40L, induit les monocytes à produire du TNF α et de l'IL-12 par les monocytes (Liu *et al.* 2000).

3. Les autres pathologies inflammatoires.

L'expression d'IL-15 est augmentée dans d'autres pathologies inflammatoires comme la sarcoïdose. C'est une maladie qui affecte principalement les poumons. Des taux élevés d'ARNm et de protéine IL-15 sont retrouvés dans les macrophages isolés à partir de lavages bronchio-alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose active (Agostini *et al.* 1996; Zissel *et al.* 2000). L'IL-15 induirait la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ pulmonaires (Agostini *et al.* 1996; Agostini *et al.* 1999). L'IL-15 jouerait un rôle au niveau des lésions épithéliales chez les patients atteints de la maladie coeliaque (Di Sabatino *et al.* 2005). L'IL-15 intervient également dans diverses inflammations hépatiques chroniques (Kakumu *et al.* 1997), maladies autoimmunes de la thyroïde (Ajjan *et al.* 1997), sclérose en plaques (Pashenkov *et al.* 1999), formation de cicatrices hypertrophiques (Castagnoli *et al.* 1999), pemphigoïdes bulleuses (Ameglio *et al.* 1999).

C. Le rejet de greffe.

L'IL-15 pourrait jouer un rôle important dans le rejet de greffe allogénique. Ce phénomène inflammatoire est caractérisé par l'infiltration et l'activation de cellules immunitaires dans l'organe transplanté. Le taux de transcrits d'IL-15 est augmenté au cours du rejet de greffes rénales (Pavlakis *et al.* 1996). L'IL-15 serait donc impliquée dans le rejet de greffe rénale (Li *et al.* 1998; Baan *et al.* 2002) mais également d'ilôts pancréatiques (Ferrari-Lacraz *et al.* 2001; Ferrari-Lacraz *et al.* 2002). Les ARNm de l'IL-15 ont aussi été détectés lors de la transplantation hépatique (Baan *et al.* 1998). Les rejets de greffes cardiaques et hépatiques font intervenir les lymphocytes T circulants (Baan *et al.* 2000) et agissent en réponse à l'IL-15 produite par les macrophages CD68⁺ infiltrés dans le transplant (Baan *et al.* 1999).

D. Les cancers.

(1) La leucémie lymphocytaire T de l'adulte.

L'infection des lymphocytes T par le virus HTLV-1 est susceptible d'entraîner une leucémie lymphocytaire T de l'adulte (ATL, "Adulte T cell Leukemia"). Cette maladie est caractérisée, dans sa phase précoce, par une prolifération anormale des lymphocytes T dépendante d'une boucle autocrine d'IL-2 (Maeda *et al.* 1987; Yodoi *et al.* 1987). Les phases tardives de la maladie font intervenir les facteurs de transduction JAK1 et 3, et STAT3 et 5 (Xu *et al.* 1995; Takemoto *et al.* 1997) en l'absence d'IL-2, suggérant un possible rôle de l'IL-15 dans la prolifération des lymphocytes T qui expriment en outre la chaîne IL-15R α (Yamada *et al.* 1998). De plus, la protéine Tax du virus HTLV-1 présente une activité trans-activatrice de la transcription de l'IL-15 (Azimi *et al.* 1998) et de l'IL-15R α (Mariner *et al.* 2001; Mariner *et al.* 2002), suggérant qu'une boucle autocrine d'IL-15 pourrait être impliquée dans la prolifération des lymphocytes T.

(2) La paraparésie spastique tropicale.

La paraparésie spastique tropicale (TSP, "Tropical Spastic Paraparesis", ou HAM, "HTLV-1 Associated Myelopathy") est une pathologie neurologique touchant la gaine de myéline. Les lymphocytes T infectés par le HTLV-1 prolifèrent spontanément par des boucles autocrines IL-2 et IL-15 (Azimi *et al.* 1999; Azimi *et al.* 2000). De plus, l'IL-15 exerce une action anti-apoptotique pour les lymphocytes T CD8⁺ infectés (Azimi *et al.* 2001).

(3) Les lymphomes cutanés T épidermotropes.

Les lymphomes cutanés T épidermotropes (LCTE) regroupent les Mycosis Fongoïdes (MF), les Syndromes de Sézary (SS), et d'autres lymphomes T périphériques survenant primitivement au niveau de la peau. La protéine IL-15 est détectée dans les MF et les SS (Dobbeling *et al.* 1998; Leroy *et al.* 2001) et pourrait agir de façon autocrine/paracrine (Dobbeling *et al.* 1998). L'IL-15 et l'IL-17 prolongent la survie des LCTE (Dobbeling *et al.* 1998) en augmentant l'expression de Bcl-2 (Qin *et al.* 2001), et agissent aussi sur le cycle cellulaire (Qin *et al.* 1999). De plus, les souris transgéniques surexprimant l'IL-15 développent des infiltrats épidermiques lymphocytaires (Fehniger *et al.* 2001). L'IL-15 semble donc jouer un rôle important dans ces pathologies.

(4) La leucémie à grands lymphocytes à grains.

La leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL ou LGLLD, "Large Granular Lymphocytes Lymphoproliferative Disorder") est associée à une forte expansion en lymphocytes T et cellules NK. Ces cellules expriment les trois chaînes réceptrices IL-15R α , IL-2R β et γ_c , et prolifèrent en réponse à l'IL-15 (Zambello *et al.* 1997). Une forme membranaire d'IL-15 biologiquement active a été observée à la surface de ces cellules, alors qu'elles n'en expriment ni les transcrits ni ne la sécrètent. De plus, des souris transgéniques surexprimant l'IL-15 présentent une expansion notable des lymphocytes T CD8⁺CD44^{high} et des cellules NK, et développent une leucémie lymphocytaire létale, similaire à la LGL (Fehniger *et al.* 2001). Ainsi, la sur-activation des cellules par l'IL-15 pourrait induire une maladie lymphocytaire chronique et induire une transformation maligne des lymphocytes.

(5) Les leucémies lymphocytaires B et les myélomes.

L'IL-15 a une action proliférative *in vitro* dans les leucémies lymphocytaires B et à tricholeucocytes (Trentin *et al.* 1996). De plus, l'IL-15 assure la prolifération de la lignée leucémique myéloïde aigue MO7e (Meazza *et al.* 1998), et la lignée leucémique myéloïde K-562 exprime les trois chaînes IL-15R α , IL-2R β et γ_c (Anderson *et al.* 1995). Chez les patients atteints de myélome multiple, les plasmocytes malins expriment également les trois chaînes réceptrices de l'IL-15. L'IL-15 jouerait un rôle dans la propagation tumorale (Tinhofer *et al.* 2000).

(6) Les mélanomes.

L'IL-15 pourrait jouer un rôle dans le développement des mélanomes. En effet, les rayonnements UV provoquent une augmentation de la transcription de l'IL-15 par les kératinocytes (Mohamadzadeh *et al.* 1995). De plus, les transcrits de l'IL-15 et de la chaîne IL-15R α ont été détectés dans certaines lignées de mélanomes (Doucet *et al.* 1997; Barzegar *et al.* 1998). L'IL-15 a été détectée en intracellulaire, mais n'est pas dosable dans les surnageants de culture, et pourrait donc agir en juxtacrine (Barzegar *et al.* 1998). L'IL-15 induit le développement de mélanomes plus agressifs *in vivo* (Doucet *et al.* 1997). L'IL-15 produite par ces lignées diminuerait l'expression membranaire du HLA de classe I, ce

qui permettrait l'échappement des tumeurs vis-à-vis du système immunitaire (Gilboa 1999).

(7) Les autres tumeurs solides.

Les messagers de l'IL-15 sont retrouvés dans de nombreuses tumeurs solides comme les sarcomes d'Ewing, les ostéosarcomes, les rhabdomyosarcomes, les glioblastomes, les neuroblastomes et les mésothéliomes. Les lignées issues de carcinomes rénal ou cervical, de rétinoblastome, de gliome, de tératocarcinome, ou issues de cancer du poumon à petites cellules ou de cancer colorectal expriment les messagers de l'IL-15. Les rhabdomyosarcomes sécrètent l'IL-15 et expriment les récepteurs membranaires. Certains gliomes et glioblastomes expriment également les transcrits de la chaîne IL-15R α (Fehniger and Caligiuri 2001). Néanmoins, aucune participation de l'IL-15 n'a été mise en évidence dans l'établissement et le développement de ces cancers.

E. Les infections microbiennes.

L'expression d'IL-15 est augmentée suite aux infections par *Burkholderia pseudomallei*, le Bacille de Calmette-Guérin (BCG) ou *Mycobacterium tuberculosis*. La surexpression d'IL-15, *in vivo*, active la réponse immunitaire cytotoxique des cellules T et NK, et protège contre l'infection par le BCG. L'IL-15 a un rôle protecteur, également, contre l'infection par *Toxoplasma gondii* (Khan *et al.* 2002). De plus, l'administration d'IL-15 avant une infection par *Plasmodium falciparum*, augmente la défense immunitaire de l'hôte en favorisant l'élimination du pathogène par activation et prolifération des lymphocytes T $\gamma\delta$. Ces derniers interviennent également dans la protection contre *Salmonella choleraesuis* et *Escherichia coli*. Lors de l'infection par *Listeria monocytogenes*, les cellules épithéliales intestinales produisent de l'IL-15 qui va agir sur la prolifération et la sécrétion cytokinique des IELs CD8 $\alpha\alpha$. L'IL-15, lors de cette infection, va également induire une forte sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T CD8 $^{+}$ mémoires. L'infection des monocytes par *Mycobacterium leprae* provoque une réponse cellulaire T dépendant de la sécrétion d'IL-15. Enfin, l'IL-15 montre une action anti-microbienne contre *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* (Fehniger and Caligiuri 2001).

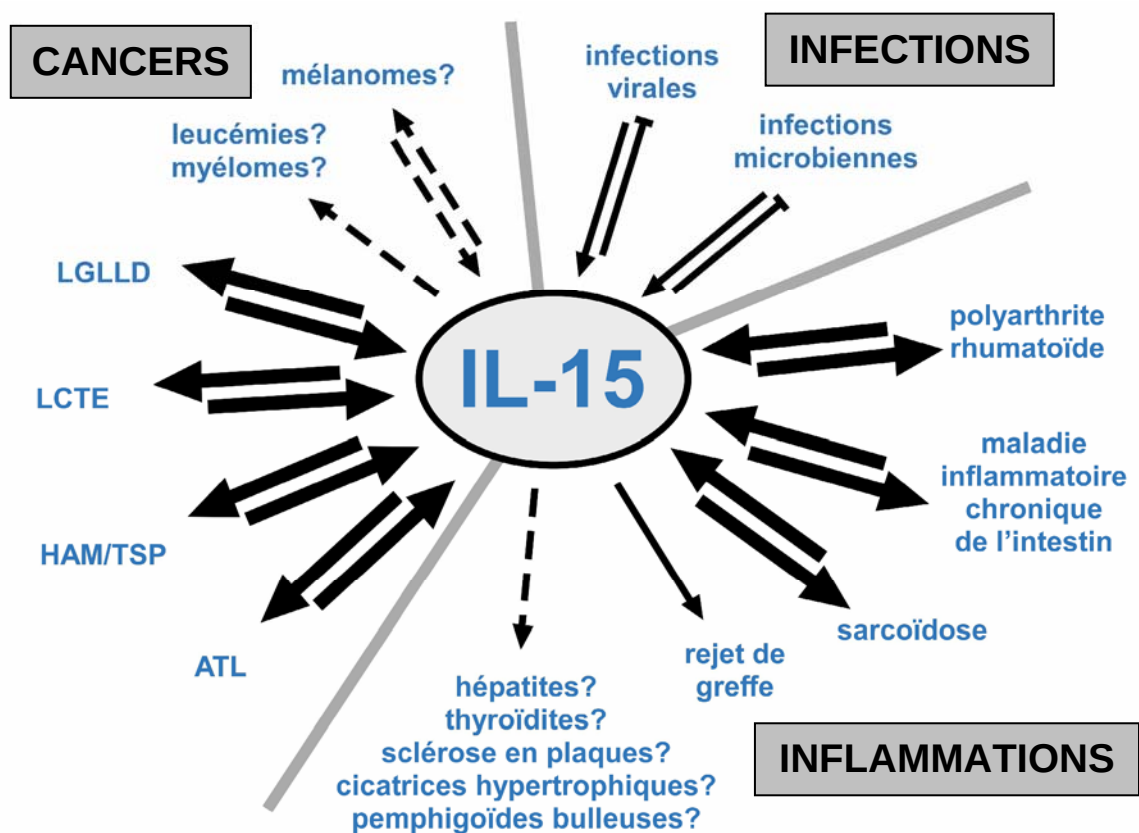


Figure 8 : IL-15 et Pathologies (Bernard J., Thèse, 2003).

V. L'IL-15 en thérapie.

L'IL-15 n'a pas encore été utilisée en essai thérapeutique, seulement quelques études précliniques ont permis d'analyser les effets *in vivo* de l'administration d'IL-15. Une simple dose d'IL-15 dans des souris saines résulte en un accroissement de la prolifération des cellules T CD8⁺ mémoires sans affecter les lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Après administration d'IL-15 ou chez les souris transgénique pour l'IL-15, on observe une augmentation de l'activité anti-microbienne (Alpdogan and van den Brink 2005).

L'administration d'IL-15 aux souris, moins toxique que l'IL-2 (Katsanis *et al.* 1996), accroît l'activité anti-tumorale après transplantation syngénique de la moelle osseuse, en favorisant la reconstitution et la fonction des cellules NK, NK-T et CD8⁺. Cependant, l'IL-15 est capable d'aggraver la GVHD ("Graft vs. Host Diseases"), ainsi l'administration d'IL-15 au receveur ne doit avoir lieu qu'après déplétion de la moelle osseuse en lymphocytes T. De plus l'administration d'IL-15 peut augmenter l'activité GVL ("Graft vs. Leukemia") (Alpdogan *et al.* 2005).

Les souris transgéniques pour l'IL-15 porteuse d'une tumeur ou l'administration d'IL-15 dans les souris cancéreuses, s'accompagne d'une activation de la fonction des cellules T et NK résultant en une augmentation de l'activité anti-tumorale. De plus, l'administration d'IL-15 peut augmenter les réponses T antigène-spécifiques après (i) le transfert de lymphocytes T provenant d'une souris transgénique pour le TCR où les cellules T CD8⁺ reconnaissent l'antigène de mélanome gp100, ou (ii) la vaccination avec des cellules dendritiques chargées en peptides. L'IL-15 pourrait être utilisée comme un adjuvant potentiel pour la thérapie cellulaire et les diverses stratégies de vaccination (Alpdogan and van den Brink 2005).

Différents agents inhibiteurs de l'action de l'IL-15 ont été élaborés comme la chaîne IL-15R α soluble liée à un fragment Fc d'une immunoglobuline, des mutants de l'IL-15, des anticorps soit dirigé directement contre l'IL-15 ou contre la sous-unité réceptrice IL-2R β . Un antagoniste IL-15 a été produit en mutant des glutamines en C-terminal de l'IL-15 (Kim *et al.* 1998). Ce mutant diminue le rejet d'allogreffes de cellules des îlots pancréatiques d'allogreffe chez la souris (Ferrari-Lacraz *et al.* 2001; Ferrari-Lacraz *et al.* 2002). Des

anticorps contre l'IL-15 ont été utilisés efficacement dans différents modèles de maladies autoimmunes dont le psoriasis. De tels anticorps sont également efficaces chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. L'administration de la chaîne sIL-15R α recombinante diminue fortement *in vivo* l'arthrite induite par le collagène (Ruchatz *et al.* 1998), retarde le rejet de greffe cardiaque (Smith *et al.* 2000), réduit *in vivo* l'inflammation aigue induite et inhibe *in vivo* la prolifération lymphocytaire T induite (Wei *et al.* 2001) et prévient de l'induction d'une inflammation de type allergique au niveau des bronches (Ruckert *et al.* 2005). Le sIL-15R α bloque également l'IL-15 endogène *in vivo* dans des modèles immunitaires anti-tumorales (Gri *et al.* 2002) et antimicrobiennes (Khan *et al.* 2002).

LES RECEPTEURS SOLUBLES DE CYTOKINES

Les récepteurs solubles de cytokines régulent les évènements inflammatoires et immunitaires en exerçant un rôle agoniste ou antagoniste pour les réponses aux cytokines.

I. Mode de production des récepteurs solubles.

A. Mécanismes de génération d'un récepteur soluble.

Les récepteurs solubles peuvent être générés par différents mécanismes, dont deux majeurs. Le premier processus fait appel à une coupure protéolytique et libération ("shedding") sous forme soluble du récepteur original lié à la membrane cellulaire. Le second mécanisme, plus spécialisé, consiste en une synthèse *de novo* à partir d'un ARN messager spécifique de la forme soluble issue d'un épissage alternatif, et différent de ceux codant pour les formes membranaires. On peut classer les récepteurs solubles en fonction de leur mode de génération, ceux qui sont produits par "shedding" et ceux issus d'un épissage alternatif (Fernandez-Botran and Vitetta 1991). Néanmoins, certains récepteurs solubles, comme le sIL-6R α et le sIL-4R α , peuvent être générés par les deux processus. D'autres modes de production de récepteurs solubles ont été mis en évidence comme le relargage de récepteurs complets dans le contexte de vésicules en provenance d'exosomes, ou encore à partir d'un clivage d'une forme de récepteur ancré à la membrane par une structure GPI.

1. Coupure protéolytique

Certains récepteurs solubles de cytokines, tel le sIL-2R α ou le sTNF-R (type I et II), sont générés exclusivement par clivage protéolytique de la forme membranaire du récepteur, et ne présentent que l'ARN messager codant pour la forme totale du récepteur membranaire (Rubin and Nelson 1990; Smith *et al.* 1994). Des protéases agissent au niveau de la membrane plasmique et coupent la protéine membranaire aux alentours du

domaine transmembranaire, ce qui aboutit à la libération d'une forme tronquée du récepteur dans le milieu extracellulaire. Cependant les récepteurs membranaires cytokiniques n'ont pas l'exclusivité de ce processus protéolytique. D'autres molécules enchâssées dans la membrane peuvent subir ce type de mécanisme. Par exemple, le TNF α est relargué à partir d'un précurseur membranaire par coupure protéolytique (Gearing *et al.* 1994). De nombreuses protéines membranaires comme certaines molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, E-selectin, VCAM-1, CD44) et des récepteurs de facteurs de croissance (EGF, TGF α , NGF) sont également relarguées suite à un clivage protéolytique (Gearing and Newman 1993; Smith *et al.* 1994).

Le clivage protéolytique des récepteurs trans-membranaires a le plus souvent été montré comme étant dépendant de métalloprotéases de la famille des ADAMs ("A Desintegrin And Metalloprotease"). Les ADAMs constituent une grande famille de protéines transmembranaires de type I (Black 2002). L'ADAM17 ou TACE ("TNF α Converting Enzyme") est une enzyme protéolytique typique qui a été identifiée grâce à son aptitude à couper le TNF α vers sa forme soluble (Black *et al.* 1997; Moss *et al.* 1997) (**Figure 9A**). TACE est impliqué dans le clivage d'ectodomains et le relargage de nombreux récepteurs de cytokines appartenant à différentes superfamilles, dont la famille du TNFR, comprenant le TNFR de type II (TNFRSF1B, TNFR2), TNFR1, CD30 (TNFRSF8), et CD40 (TNFRSF5); la famille IL-1/TLR (IL-1RII); la famille de récepteur de cytokine de type I (IL-6R α); et l'IL-15R α (Budagian *et al.* 2004; Levine 2004).

Les mécanismes d'activation de TACE ne sont pas clairement élucidés. L'activation de TACE pourrait se faire par (i) phosphorylation de sa partie intra-cytoplasmique, par (ii) interaction entre son domaine intracytoplasmique et les protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation, ou encore par (iii) activation de TACE induisant sa maturation puis acheminement de la protéine mature à la surface de la cellule. La plupart des études portant sur les mécanismes d'activation de TACE se font en utilisant la PMA, un agent activation non-physiologique de la protéine kinase C (Mezyk *et al.* 2003).

Les métalloprotéases matricielles (MMP) possèdent également une activité protéolytique. MMP-12 (macrophage metalloelastase) est impliquée dans le clivage du domaine amino-terminal (D1) du récepteur plasminogène de type urokinase (Koolwijk *et al.* 2001). MT1-MMP est impliqué dans le clivage de CD44, relargant dans le milieu un fragment soluble de 70 kDa (Kajita *et al.* 2001). MT1-MMP et MT3-MMP sont impliqués dans le clivage du TGF- β R de type III (T β R-III) betaglycan (Velasco-Loyden *et al.* 2004).

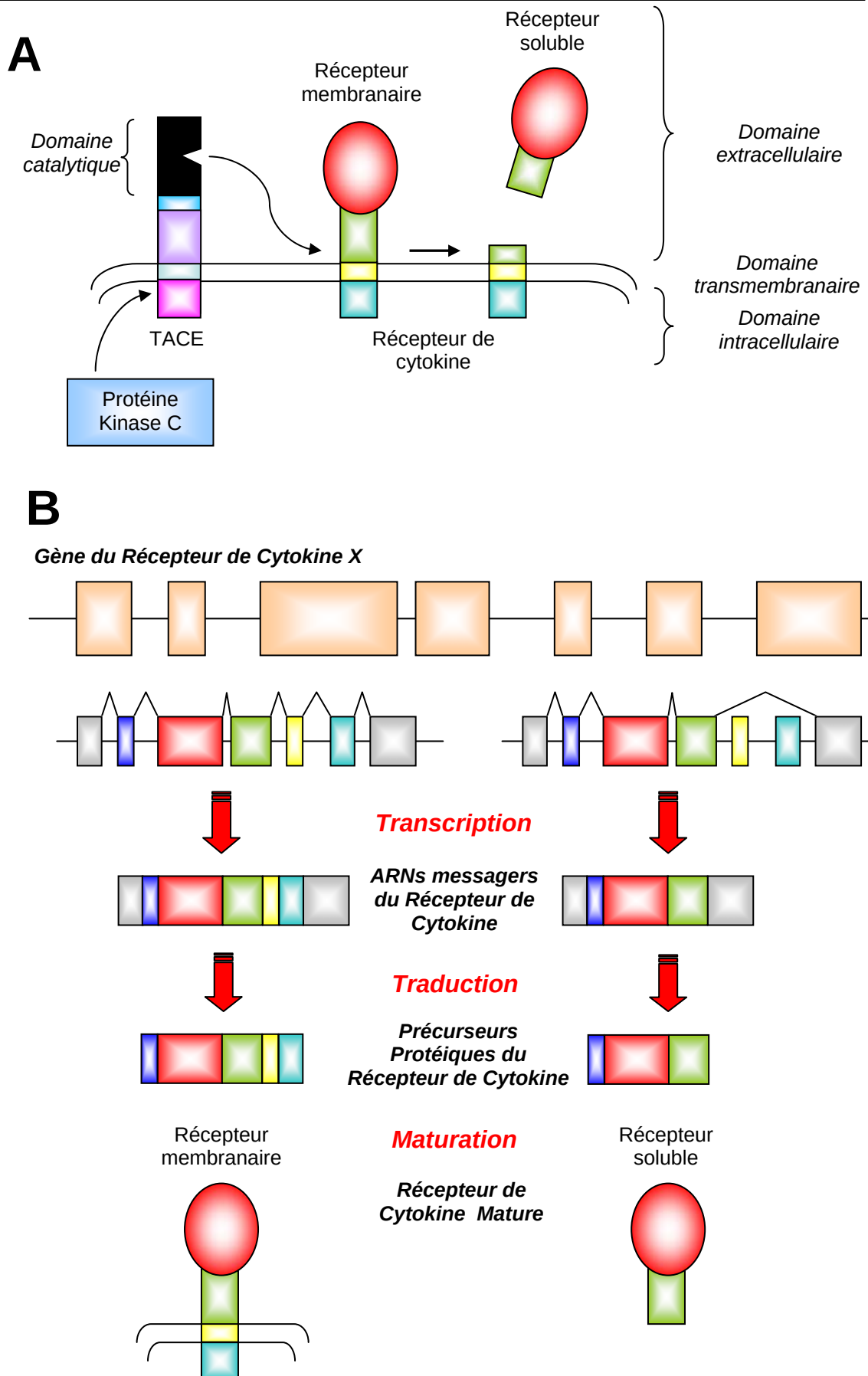


Figure 9 : Les Deux Principaux Modes de Génération des Récepteurs Solubles. A. Coupure Protéolytique. B. Epissage Alternatif.

2. Transcription des ectodomaines des récepteurs solubles de cytokines.

Un autre mécanisme de génération de récepteurs soluble de cytokines est la synthèse de récepteurs qui possèdent un peptide signal mais qui sont dépourvus de domaine transmembranaire et qui sont sécrétés. Ces récepteurs solubles peuvent être générés par deux voies différentes.

a) Synthèse à partir d'un épissage alternatif de l'ARN messager

L'existence de différents ARN messagers codant pour les formes membranaires et solubles de différents récepteurs de cytokines ont été décrits pour: la super-famille des récepteurs de cytokines de classe I: l'IL-4R α , IL-5R α , IL-6R α , IL-7R α , IL-9R α , EpoR, G-CSFR, GM-CSF-R α , gp130, et LIFR α ; classe II: (type I IFNR (IFNAR1 et IFNAR2 α)); la famille IL-1R/TLR (IL-1RII, IL-1RAcP); récepteur de la famille TGF- β (T β R-I); la superfamille TNFR (TNFRSF6/Fas/CD95, TNFRSF9/4-1BB/CD137), et le IL-17R (Levine 2004). Dans tous les cas, le transcrit original dérive d'un seul et même gène, et l'épissage alternatif conduit à deux types de messagers (Wrighton *et al.* 1992). Des délétions ou des terminaisons précoces de transcription en amont du domaine transmembranaire conduisent à un messager du récepteur tronqué codant pour un récepteur soluble. Ce récepteur, ainsi généré, conserve son domaine de liaison à son ligand, mais se trouve dépourvu du domaine transmembranaire. Le récepteur murin de l'IL-4 (IL-4R α) a été le premier récepteur de cytokine découvert présentant deux messagers distincts codant pour la forme membranaire et la forme soluble (Mosley *et al.* 1989). L'ADN complémentaire codant pour la forme soluble contient une insertion de 114 paires de bases en amont des séquences codant pour le domaine transmembranaire, résultant en l'addition de six nouveaux acides aminés et une terminaison précoce. L'insertion de 114 acides aminés correspond à l'exon 8 du gène de l'IL-4R α , et son inclusion est régulée par un mécanisme d'épissage alternatif (Wrighton *et al.* 1992). Cela aboutit à la synthèse du IL-4R α tronqué, dépourvu des domaines transmembranaire et intracytoplasmique du récepteur total de 140 kDa. Dans le cas de l'ADN complémentaire cloné codant pour le récepteur soluble de l'IL-7, une délétion d'une séquence impliquée dans le domaine

transmembranaire, perturbe le cadre de lecture en causant l'addition de 27 nouveaux acides aminés et une terminaison précoce (Goodwin *et al.* 1990). Les signaux et les mécanismes régulant l'épissage alternatif n'ont pas encore été élucidés. Il est possible que l'activation cellulaire et/ou d'autres événements pourraient influencer un tel processus, conduisant à la transcription préférentielle d'une forme par rapport à une autre. Un tel processus régulateur pourrait avoir d'importants effets régulateurs sur l'activité de la cytokine impliquée en altérant l'expression différentielle des formes soluble et membranaire de son récepteur, et modifiant, de ce fait, la réponse des cellules cibles.

b) Transcription de gènes distincts codant pour des protéines solubles liant les cytokines.

La seconde voie est la transcription de gènes distincts qui partagent une homologie avec les récepteurs de cytokines et qui codent pour des protéines solubles liant les cytokines, BP ("Binding Protein"). La signalisation par le TNFR et la superfamille de cytokine de classe II peut être régulé de cette façon. Le récepteur Decoy 3 (DcR3/TNFRSF6B/TR6/M68) est un membre sécrété de la superfamille TNFR qui contient un peptide signal et quatre domaines en tandem riche en cystéines mais dépourvu de domaine transmembranaire. DcR3 peut lier le Fas ligand (TNFSF6), LIGHT (TNFSF14), et TL1A ("endothelial cell-derived TNF-like factor"), et inhibe l'apoptose en empêchant l'association des ligands avec Fas, le récepteur de la lymphotoxine β (TNFRSF3), et le DR3 ("Death Receptor 3"). L'ostéoprotégérine (TNFRSF11b), un autre membre de la superfamille de TNFR, est aussi généré comme une protéine soluble sécrétée qui lie le TNFSF11 et inhibe la différenciation ostéoclastique (Levine 2004). IL-22RA2 (IL-22R α 2) est un membre de la famille des récepteurs de cytokines de classe II, dépourvu de domaine transmembranaire et qui agit comme une protéine antagoniste liant l'IL-22 (Dumoutier *et al.* 2001; Kotenko *et al.* 2001; Xu *et al.* 2001). L'IL-18-BP, qui partage de faibles homologies avec l'IL-1RII, est une autre protéine liant les cytokines qui est dépourvue de domaine transmembranaire et qui inhibe les fonctions de l'IL-18 (Novick *et al.* 1999).

3. Mécanisme de relargage de récepteurs de cytokine par l'intermédiaire des vésicules exosome-like.

Les exosomes sont de petites vésicules membranaires d'origine endocytaire (Thery *et al.* 2002). La forme totale du TNFR1 peut être constitutivement relarguée par les cellules endothéliales vasculaires humaines dans le milieu extracellulaire comme le constituant d'une vésicule exosome de 20-50 nm de diamètre (Hawari *et al.* 2004). Les vésicules exosome TNFR1 issues des HUVEC n'apparaissent pas posséder de capacité de signalisation intrinsèque. Similairement, le FasL associé à la membrane peut être relargué à partir de cellules de mélanomes sous forme de microvésicules, de 100 à 200 nm de diamètre, avec des effets consécutifs de type pro-apoptotique sur les cellules lymphoïdes Fas-sensibles, diminuant ainsi les réponses anti-tumorales (Andreola *et al.* 2002). Le relargage de la forme totale du récepteur de cytokine dans le contexte de vésicules exosome représente un mécanisme alternatif de génération de récepteurs extra-cellulaires.

4. Génération des récepteurs solubles de cytokines par relargage d'ectodomains lié par une ancre GPI.

Le clivage d'ectodomains de récepteurs liés à la membrane par une ancre GPI a été montré pour le CNTFR α ("Ciliary Neutrophilic Factor Receptor α "), et est dépendant de la PLC ("phospholipase C"). À l'instar de la *trans*signalisation de l'IL-6, le CNTFR α soluble permet au CNTF d'agir sur les cellules qui normalement sont insensibles à cette cytokine (Davis *et al.* 1991; Davis *et al.* 1993).

5. Les récepteurs solubles de cytokines issus de virus.

L'utilisation de récepteurs solubles de cytokines comme modulateurs efficaces de la réponse immunitaire innée a été exploitée par les virus. Ils synthétisent des protéines homologues des récepteurs de cytokines de mammifères afin d'échapper au système de défense de l'hôte. Les poxvirus, comme le cowpox, la variole, le myxome et le virus du fibrome de Shope, codent pour des homologues de la superfamille du TNFR (Cunnion 1999). Le premier TNFR viral identifié est la protéine T2 du virus du fibrome de Shope, qui est structurellement proche du TNFR2, mais sans la partie transmembranaire. T2 est sécrété par les cellules infectées par le virus et agit comme une protéine liant le TNF (Smith *et al.* 1990). Une protéine proche de la protéine T2 est codée par le virus du myxome (Upton *et al.* 1991). Quatre homologues du TNFR, issus du poxvirus, ont été

identifiées: les protéines Crm ("Cytokine response modifying"), qui lient différents ligands. CrmB et CrmD lient le TNF et la lymphotoxine α , alors que CrmC et CrmE lient seulement TNF. Les poxvirus, le cowpox et le mousepox, expriment un homologue soluble de CD30, qui peut lier CD30L avec une forte affinité, et inhibe l'inflammation de type Th2 *in vivo*. Des homologues solubles viraux du récepteur de l'IFN de type I, du récepteur de l'IFN- γ , l'IL-1RII, et la protéine liant l'IL-18 ont également été identifiés (Levine 2004).

B. Régulation de la production du récepteur soluble.

La plupart des études originales sur les différents récepteurs solubles se basent sur des observations *in vitro* et/ou des études de clonage. Cependant la production de récepteurs solubles a été confirmée *in vivo* chez l'homme comme chez l'animal. Néanmoins, les informations sur le type de cellules responsables de la production de différents récepteurs solubles et les facteurs qui régulent leur production sont incomplètes. Les relations entre l'expression du récepteur membranaire et la synthèse et/ou la libération de la forme soluble doivent être caractérisées plus précisément.

En accord avec la notion selon laquelle les récepteurs solubles jouent un rôle physiologique de régulateur de l'activité cytokinique, des observations apparaissent indiquer que le processus de génération de récepteurs solubles est réellement régulé pendant la réponse immunitaire. La plupart des récepteurs solubles sont produits à de faibles concentrations, mais leur production est accrue en réponse à l'activation cellulaire (Rubin and Nelson 1990; Honda *et al.* 1992; Chilton and Fernandez-Botran 1993; Cope *et al.* 1995). Ainsi, des concentrations sériques de sIL-2R α , sTNF-R (types I et II), et sIL-6R α ont été retrouvées à des niveaux élevés dans des conditions cliniques associées à des réponses immunitaires aiguës et/ou inflammatoires (Rubin and Nelson 1990; Arend 1995). Plusieurs facteurs, dont les molécules d'activation cellulaire et les cytokines, apparaissent jouer un rôle dans la régulation de la production de récepteurs solubles pendant des réponses immunitaires ou inflammatoires.

1. Activation cellulaire.

L'activation cellulaire des lymphocytes, monocytes et autres populations cellulaires conduisent à une régulation positive des différents récepteurs de cytokines à la surface des cellules (Lowenthal *et al.* 1985; Ohara and Paul 1988). Par conséquent, il n'est pas surprenant d'observer que la production de formes solubles de ces mêmes récepteurs, en particulier ceux issus d'un "shedding" de la forme membranaire, soit aussi augmentée après activation cellulaire. La nature du signal activateur varie selon la cellule. L'identité des cellules produisant les récepteurs solubles *in vivo* est rarement élucidée et il est également difficile de prévoir quel stimulus est responsable de l'accroissement de la production d'un récepteur soluble spécifique *in vivo*. Cependant, des observations ont montré que la production de formes solubles de récepteurs de cytokines impliquées dans les fonctions et la prolifération des lymphocytes T (IL-2 et IL-4) était augmentée en réponse à une activation T (Rubin and Nelson 1990; Chilton and Fernandez-Botran 1993). La production de formes solubles de récepteur de cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α) est régulée positivement après activation monocytaire et/ou en réponse à une inflammation (Symons *et al.* 1990). L'activation T a également été montrée pour augmenter la production de sIL-6R α et de sTNF-R (Honda *et al.* 1992; Bemelmans *et al.* 1994; Cope *et al.* 1995).

La conséquence principale de l'activation cellulaire est la production et la libération de cytokines. L'augmentation de la production de récepteurs solubles suite à l'activation cellulaire résulte en partie de l'effet de ces cytokines sécrétées. Pour exemple, l'utilisation d'un anticorps anti-IL-4 neutralisant inhibe partiellement la production de sIL-4R par les cellules spléniques de souris stimulées par la concanavaline A ou par des antigènes spécifiques (Chilton and Fernandez-Botran 1993; Fernandez-Botran *et al.* 1995). Après l'action de la cytokine, la production de récepteur soluble tend à désensibiliser les cellules, et donc à limiter l'effet de la cytokine dans le temps. Le processus de désensibilisation est la conséquence soit de la propriété antagoniste des récepteurs solubles, soit de la diminution de l'expression de la forme membranaire du récepteur par coupure protéolytique.

2. Cytokines.

De nombreuses observations ont montré que la production de récepteurs solubles était régulée par des cytokines. Il apparaît que la production de certains récepteurs, comme le sIL-2R α (Lotze *et al.* 1987; Voss *et al.* 1989), le sIL-4R α (Chilton and Fernandez-

Botran 1993) et les sTNF-R (Lantz *et al.* 1990; Cope *et al.* 1995), est régulée par leur propre ligand, suggérant un mécanisme de rétro-contrôle dans lequel la présence de la cytokine induit la production et la sécrétion de son récepteur soluble spécifique, dans le but de réguler négativement sa propre activité. Des observations ont montré que la production de sIL-4R α était étroitement liée à la réponse immunitaire caractérisée par une sécrétion importante d'IL-4, à savoir la réponse Th2. En effet, on observe (i) une augmentation de la production de sIL-4R α par les cellules murines fraîchement isolées, lymphocytes T et B et macrophages en réponse à l'IL-4 (Chilton and Fernandez-Botran 1993); (ii) une augmentation de l'expression de l'ARN messager codant pour la forme soluble du récepteur de l'IL-4 dans les cellules spléniques stimulées par l'IL-4; (iii) une corrélation entre l'expression du sIL-4R α *in vivo* et le développement de la réponse Th2 dans un modèle murin de schistosome (Fernandez-Botran *et al.* 1995); et (iv) une régulation positive de la production de sIL-4R α par des clones Th2 mais pas par des clones Th1 après une stimulation antigénique (Fernandez-Botran *et al.* 1996).

Des relations similaires existent entre d'autres cytokines et leur récepteur soluble. Dans le cas de l'IL-2, la cytokine elle-même peut augmenter l'expression membranaire de la chaîne réceptrice IL-2R α (Bismuth *et al.* 1984; Smith and Cantrell 1985). L'administration d'IL-2 chez des patients atteints de cancer a pour conséquence le développement de cellules présentant le récepteur de l'IL-2 et l'augmentation du niveau d'expression du sIL-2R α dans le sérum (Lotze *et al.* 1987). De même, de fortes concentrations de sTNF-R (types I et II) ont été retrouvées dans le sérum dans des conditions favorisant la sécrétion de TNF α , comme l'endotoxémie dans le choc septique (Leeuwenberg *et al.* 1994; Kuhns *et al.* 1995). Ces observations suggèrent que le TNF α régule également la production de son propre récepteur. De plus, l'injection de TNF α chez des patients résulte en une augmentation de l'expression de sTNF-R dans leur sérum (Lantz *et al.* 1990). Les mécanismes responsables de la régulation de la production des récepteurs solubles par leur propre ligand ne sont pas totalement clairs. Une hypothèse serait que la liaison de la cytokine sur son récepteur membranaire pourrait induire son "shedding".

Outre l'effet régulateur de leur propre cytokine, il existe des mécanismes de contrôle de la production de récepteur soluble par des cytokines indépendantes. Par exemple, l'activation de lymphocytes B murins par l'IL-5 augmente l'expression de l'IL-

2R α membranaire et soluble par ces cellules (Loughnan and Nossal 1989). L'IL-6 et l'IFN γ ont été décrits comme augmentant la production de sIL-4R α par une lignée cellulaire myéloïde et des macrophages dérivés de la moelle osseuse (Ruhl *et al.* 1993). L'IL-1 a la capacité de réguler positivement l'expression membranaire du TNF-R de type I et d'augmenter la concentration de sTNF-R de types I et II chez des patients traités par de l'IL-1 β (Bargetzi *et al.* 1993). Des cytokines peuvent aussi se réguler mutuellement. L'IL-1 β induit la production de sIL-4R α par les cellules Th2 murines (Fernandez-Botran *et al.* 1996), alors que l'IL-4 favorise la production du sIL-1R type II et du récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1ra) (Arend 1995).

3. Autres facteurs.

D'autres signaux jouent un rôle dans la régulation de la production et la sécrétion de récepteurs solubles. Certains signaux sont générés par des contacts directs entre cellules, et pourraient être médiés par un signal de co-stimulation (CD28/B7-1,-2, gp39/CD40). Une interaction physique entre des cellules murines Th2 et des CPA suffit à activer la production de sIL-4R α (Fernandez-Botran *et al.* 1996). Des cas de pathologies hématologiques ou d'infections virales, en particulier par le virus HTLV-1, résultent en une expression constitutive de l'IL-2R α membranaire et une production importante de sIL-2R α (Arend 1995).

II. Fonctions immunorégulatrices des récepteurs solubles de cytokines.

A. Effets antagonistes.

La liaison d'une molécule de cytokine à son récepteur soluble empêche, dans la plupart des cas, sa liaison à son récepteur membranaire fonctionnel, et par conséquent inhibe la signalisation résultante et la réponse biologique. Les récepteurs solubles de cytokines agissent donc comme des inhibiteurs compétitifs de la liaison et de l'activité de leur cytokines respectives *in vitro*. La plupart des récepteurs solubles de cytokines agissent

ainsi, à l'exception du sIL-6R α , qui est capable d'interagir avec sa propre sous-unité transductrice gp130, et de générer un signal agoniste.

Les effets antagonistes des récepteurs solubles sur l'activité des cytokines possèdent plusieurs caractéristiques importantes en commun (**Figure 10A**):

(1) L'effet antagoniste est cytokine-spécifique.

La liaison d'une cytokine pour son récepteur étant spécifique, l'inhibition engendrée par le récepteur soluble se trouve restreinte à la liaison et l'activité de son propre ligand (Mosley *et al.* 1989; Fernandez-Botran and Vitetta 1990).

(2) L'effet antagoniste est inversement lié à la concentration de cytokine.

De part sa nature compétitive, le degré d'inhibition causé par un taux constant de récepteur soluble décroît avec l'augmentation de la concentration de cytokine.

(3) L'effet antagoniste est influencé par les affinités de liaison de la cytokine pour ses récepteurs soluble et membranaire.

L'association de la chaîne réceptrice spécifique du ligand avec les sous-unités transductrices conduit à la formation d'un récepteur membranaire de forte affinité. L'affinité de ces récepteurs membranaires multimériques s'avère, souvent, supérieure à l'affinité des récepteurs solubles. Par exemple, la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (membranaire ou soluble) lie l'IL-2 avec une basse affinité (de l'ordre de $K_d = 10$ nM), mais l'association avec les sous unités IL-2R β et IL-2R γ , résulte en la formation d'un récepteur trimérique de forte affinité ($K_d = 10$ pM) (Lowenthal and Greene 1987; Wang and Smith 1987). Ainsi, le sIL-2R α possède une affinité approximativement 1000 fois plus faible que celle du récepteur membranaire fonctionnel, et par conséquent ne constitue pas un compétiteur très efficace (Jacques *et al.* 1987; Baran *et al.* 1988). Malgré le fait que le sIL-2R α inhibe spécifiquement l'activité de l'IL-2, de fortes concentrations sont nécessaires (Treiger *et al.* 1986). Au contraire, les récepteurs solubles capables de lier leur ligand avec une affinité comparable à celle du récepteur membranaire fonctionnel (multimérique), comme le sIL-4R et les sTNF-R, sont d'efficaces compétiteurs à faibles concentrations (Fernandez-Botran and Vitetta 1990; Dayer and Burger 1994).

La plupart des récepteurs solubles agissent comme des inhibiteurs spécifiques de cytokine, s'ils sont présents à des concentrations adéquates. La concentration de récepteurs solubles nécessaire pour l'inhibition est influencée par la concentration de la cytokine présente et par la différence d'affinité entre le récepteur soluble et le récepteur membranaire. Les effets antagonistes des récepteurs solubles jouent un rôle important dans la régulation négative des réponses immunitaires et préviennent des effets toxiques de certaines cytokines (Fernandez-Botran and Vitetta 1991; Debets and Savelkoul 1994). L'intérêt d'administrer des récepteurs solubles endogènes pour agir en tant qu'antagonistes de l'activité cytokines *in vivo* a été confirmé dans de nombreuses expériences (Debets and Savelkoul 1994; Gessner and Rollinghoff 1994; Maliszewski *et al.* 1994; Arend 1995).

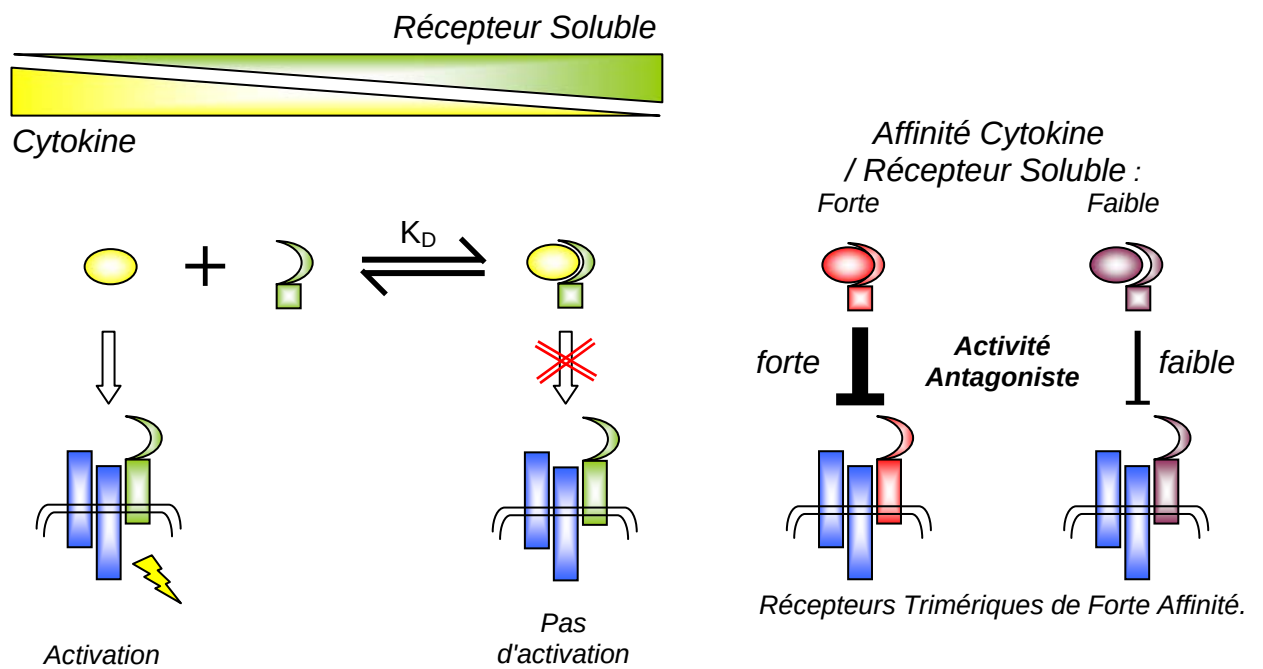
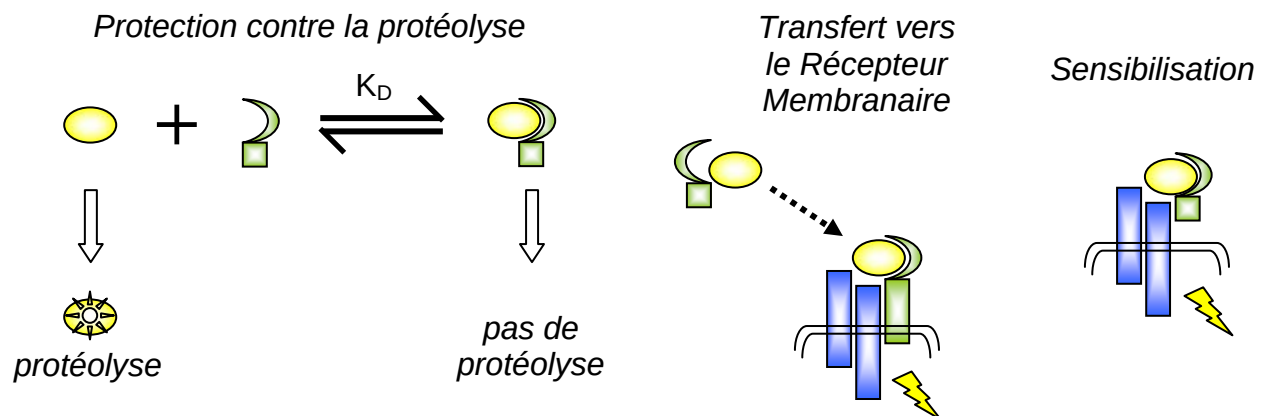
A**B**

Figure 10 : Fonctions Immunorégulatrices des Récepteurs Solubles de Cytokines. A. Effets Antagonistes. B. Effets Agonistes.

B. Rôle de transporteur ("carrier") et effet agoniste.

Certains récepteurs solubles ont été décrits comme ayant des propriétés de transporteur, ou "carrier" (Fernandez-Botran and Vitetta 1991; Mohler *et al.* 1993). Plusieurs récepteurs solubles potentialisent l'activité de leur propre cytokine *in vivo* en les protégeant notamment de la dégradation protéolytique. Ce mécanisme implique plusieurs effets sur les cytokines (**Figure 10B**):

(1) Accroître la stabilité de la cytokine.

La liaison de la cytokine sur son récepteur soluble accroît la stabilité moléculaire et en conséquence réduit l'activité de dégradation. Par exemple, la liaison de la forme bioactive trimérique du TNF à son récepteur soluble ralentit sa dégradation sous forme de monomères, et ainsi prolonge son activité biologique (Aderka *et al.* 1992).

(2) Protection contre la protéolyse.

La liaison de la cytokine sur son récepteur soluble peut la protéger contre l'action d'enzymes protéolytiques. Des expériences, *in vitro*, ont montré que la présence de sIL-4R freine la dégradation de l'IL-4 par la trypsine (Fernandez-Botran and Vitetta 1991). De même, *in vivo*, l'injection en intraveineuse de sIL-4R chez la souris, réduit la dégradation protéolytique d'IL-4 radiomarquée (Ma *et al.* 1996).

(3) Transfert de la cytokine de son récepteur soluble vers son récepteur membranaire.

Par la nature réversible de la liaison cytokine-récepteur, la liaison de la cytokine sur son récepteur résulte en une association transitoire. Après dissociation, la cytokine devient disponible pour son récepteur membranaire. Le sIL-4R α présente une constante de dissociation pour l'IL-4 plus rapide que le récepteur membranaire, ce qui favorise la dissociation de l'IL-4 de son récepteur soluble et, par conséquent, permet la liaison à la membrane (Fernandez-Botran and Vitetta 1991).

(4) Augmentation de la 1/2 vie et diminution de la clairance.

L'association de la cytokine avec son récepteur soluble affecte ses propriétés pharmacocinétiques *in vivo*. Des études portant sur l'administration d'IL-4 radiomarquée en présence ou en l'absence de sIL-4R α , ont montré que l'IL-4 seule était rapidement éliminée de la circulation (Ma *et al.* 1996). La présence de sIL-4R α entraîne une augmentation dose-dépendante de sa 1/2 vie concomitamment à une diminution de sa clairance sanguine et de son élimination urinaire. La liaison au sIL-4R α protège aussi l'IL-4 contre l'inactivation protéolytique *in vivo*, contribuant à un niveau d'IL-4 bioactive dans la circulation plus élevé.

Ainsi, les récepteurs solubles sont capables d'altérer les caractéristiques pharmacocinétiques de leur cytokine, de prolonger leur 1/2 vie dans la circulation et de réduire leur clairance. De tels effets vont dans le sens d'une potentialisation de l'activité de leur cytokine *in vivo*.

(5) Sensibilisation.

Certains récepteurs solubles sont capables de sensibiliser certaines cellules à l'action d'une cytokine. Les cellules n'exprimant que la gp130 membranaire sans la chaîne IL-6R sont incapables à répondre à l'IL-6 car l'IL-6 ne peut se fixer sur la gp130. Cependant, le complexe composé de l'IL-6 liée à son récepteur soluble, sIL-6R, sensibilise ces cellules à répondre à l'IL-6 (Peters *et al.* 1998).

Recepteurs	Protéolyse (P) Epissage Alternatif (EA)	Fonctions	Références
IL-1R _I	P	Rôle de IL-1RA	(Dinarello 1998)
IL-1R _{II}	P	Rôle de IL-1RA	(Dinarello 1998)
IL-2R	P	Antagoniste	(Nelson and Willerford 1998)
IL-3R	?	Antagoniste	(Mangi and Newland 1999)
IL-4R	P + EA	Antagoniste	(Gessner and Rollinghoff 2000)
IL-5R	EA	Protéine non détectée	(Weltman and Karim 2000)
IL-6R	P + EA	Sensibilisation	(Jones <i>et al.</i> 2001)
		Transsignalisation	(Montero-Julian 2001)
IL-7R	EA	Protéine non détectée	(Hofmeister <i>et al.</i> 1999)
IL-9R	EA	Protéine non détectée	(Demoulin and Renaud 1998)
IL-10R	?	Antagoniste	(Moore <i>et al.</i> 2001)
IL-11R	?	Sensibilisation	(Borbolla <i>et al.</i> 2001)
		Transsignalisation	
p40-IL-12	?	Antagoniste	(Adorini 1999)
IL-13R	?	Antagoniste	(Murata <i>et al.</i> 1999)
IL-15R	P	Antagoniste	(Waldmann <i>et al.</i> 2001)
			(Budagian <i>et al.</i> 2004)
IL-18-BP	EA	Antagoniste	(Nakanishi <i>et al.</i> 2001)
IL-22	Sécrété	Antagoniste	(Dumoutier <i>et al.</i> 2001)
			(Kotenko <i>et al.</i> 2001)
CNTF-R	P	Agoniste quand complexé avec CLC	(Davis <i>et al.</i> 1993)
	Sécrété complexé avec CLC		(Baumann <i>et al.</i> 1996)
CT-1	?	?	
CLC-R	uniquement soluble	Chaperon	(Elson <i>et al.</i> 2000)
CLC/CLF			
CLC/sCNTFR			
TNF-R _I	P	Inhibition	(Wajant <i>et al.</i> 2001)
TNF -R _{II}	P	Inhibition	(Wajant <i>et al.</i> 2001)
gp130	EA	Inhibition de la Transsignalisation	(Montero-Julian 2001)
LIF-R β	EA	Antagoniste	(Auernhammer and Melmed 2000)
OSM-R β	EA ?	?	(Gomez-Lechon 1999)
IL-2R β	EA	?	(Nelson and Willerford 1998)
IL-2R γ	P	Antagoniste	(Meissner <i>et al.</i> 2001)

Tableau 1 : Les Différents Récepteurs Solubles de Cytokines, leurs Modes de Production et leurs Actions.

III. Les propriétés des récepteurs solubles et leurs implications dans les pathologies: cas du sIL-2R α .

Des corrélations entre le niveau d'expression de certains récepteurs solubles (notamment le sIL-2R α , le sIL-6R α , et le TNF α) dans le sérum et certaines pathologies ont été observées. Leur niveau d'expression peut être utilisé à des fins diagnostiques ou comme marqueur pronostique dans différentes conditions cliniques.

L'IL-2 est une cytokine produite par les lymphocytes T CD4 et certains CD8. En plus d'être le principal facteur de croissance des cellules T, elle stimule la croissance et la différenciation des précurseurs de cellules T cytotoxiques et des cellules NK, la prolifération et la différenciation des cellules B humaines et l'activation des monocytes. Les récepteurs de l'IL-2 fonctionnels sont composés de trois sous-unités différentes, IL-2R α , IL-2R β et IL-2R γ . L'IL-2R α isolée lie l'IL-2 avec une faible affinité, et est incapable de générer un signal en l'absence des deux autres sous unités (Lowenthal and Greene 1987; Wang and Smith 1987).

Les stimulations antigénique ou mitogénique des lymphocytes B et T n'entraînent pas seulement l'induction de la sous-unité IL-2R α membranaire mais également la génération et la sécrétion de chaînes α tronquées (Rubin *et al.* 1985; Osawa *et al.* 1986; Wagner *et al.* 1986). Ces récepteurs solubles, sIL-2R α , sont approximativement 10 à 15 kDa plus courts que la forme membranaire, tout en conservant les propriétés de liaison à l'IL-2 (Josimovic-Alasevic *et al.* 1988). L'affinité de liaison du sIL-2R α pour l'IL-2 est similaire à celle retrouvée pour la chaîne α membranaire isolée, mais environ 1000 fois inférieure au complexe trimérique $\alpha\beta\gamma$ (Jacques *et al.* 1987; Baran *et al.* 1988). Cela explique la relative inefficacité du sIL-2R α à bloquer la liaison de l'IL-2 au récepteur IL-2R α biologiquement actif sur les cellules. Il a néanmoins été montré, *in vitro*, que l'activité et la liaison de l'IL-2 sont inhibées en utilisant de fortes concentrations de sIL-2R α (Treiger *et al.* 1986; Kondo *et al.* 1988). Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'un sIL-2R α endogène, potentiellement responsable d'une activité inhibitrice des fonctions de la cellule T, dans les sérums et liquides biologiques dans des conditions

pathologiques, comme la polyarthrite rhumatoïde (Symons *et al.* 1988) et la leishmaniose viscérale humaine (Barral-Netto *et al.* 1991).

La génération du sIL-2R α est médiée par le clivage protéolytique de la forme liée à la membrane. Un seul type d'ARN messenger code pour la chaîne totale membranaire, IL-2R α , et il existe aucun messenger issu d'un épissage alternatif codant pour une forme soluble potentielle. Des expériences de transfection de cellules avec de l'ADNc codant pour la forme membranaire conduisaient non seulement à l'expression de la chaîne à la surface des cellules mais également à la présence d'une forme soluble dans le surnageant de culture (Rubin and Nelson 1990). Les cellules néoplasiques et infectées par le HTLV-1 dans lesquelles l'expression de l'IL-2R α est constitutive, produisent aussi de grandes quantités de sIL-2R α . L'identité des protéases responsables de la génération du sIL-2R α est encore imprécise. Cependant une étude a montré que le clivage protéolytique de la forme membranaire de l'IL-2R α , à la surface des lymphocytes T, peut être induit par des MMPs (MMP-2 et MMP-9) dérivées de tumeurs et ainsi, supprime la capacité proliférative des cellules T (Sheu *et al.* 2001). Il a également été montré que Der p1, un allergène à activité cystéine protéase, est capable de couper l'IL-2R α de la surface des cellules T du sang périphérique, ce qui a pour conséquence d'inhiber la propagation des cellules Th1 et de favoriser le développement d'une réponse Th2 associée à un environnement allergique (Schulz *et al.* 1998).

De faibles concentrations de sIL-2R α sont retrouvées dans le sérum et l'urine d'individus sains, témoignant d'un niveau basal d'activation immunologique (Rubin *et al.* 1985). L'augmentation d'expression de sIL-2R α dans le sérum a été observée dans diverses conditions cliniques, comme les maladies infectieuses et autoimmunes. Le niveau d'expression de sIL-2R α a été validé comme un bon indicateur de l'activité pathologique et/ou de la progression de ces maladies, et a un impact direct sur le pronostic de la maladie. Dans le cas de néoplasies hématologiques, comme les pathologies associées à l'infection au HTLV-1, les leucémies à cellules chevelues, et le lymphome de Hodgkin, le taux sérique de sIL-2R α reflète la charge tumorale totale, et son accroissement est associé à la progression de la maladie (Richards *et al.* 1990; Ambrosetti *et al.* 1993; Kamihira *et al.* 1994). De plus, une augmentation de la moyenne des taux de sIL-2R α , corrélée avec la progression naturelle de la maladie, a été observée chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Prince *et al.* 1988; Honda *et al.* 1989). Dans les maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus erythemateux, les

taux de sIL-2R α sont corrélés avec une forme active de la maladie (Semenzato *et al.* 1988; Symons *et al.* 1988; Tokano *et al.* 1989). Des taux élevés de sIL-2R α ont aussi été observés dans de nombreux types d'infection virales, bactériennes et parasitiques, probablement reflétant l'état d'activation immunologique (Josimovic-Alasevic *et al.* 1988; Brown *et al.* 1989; Muller *et al.* 1989). Enfin, des taux élevés de sIL-2R α servent au pronostic de rejet dans des cas de transplantation (Perkins *et al.* 1989; Bock *et al.* 1994).

En conclusion, la mesure des taux d'expression de sIL-2R α dans les sérums et/ou dans les liquides biologiques représente un outil relativement simple et non invasif pour l'observation de l'activité, associée à une activation immunologique, de différentes maladies, de leurs réponses aux traitements et de leurs pronostics.

IV. Les formes solubles de complexes cytokine / récepteur.

A. Le système IL-6.

1. Le récepteur soluble IL-6R α .

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle qui agit sur une grande variété de cellules. Parmi ces diverses activités, on peut noter l'induction d'immunoglobulines sécrétées par les cellules B activées, la stimulation de prolifération des cellules d'hybridomes, de myélomes ou de plasmocytomes, la régulation de la réponse de la phase aigue, l'hématopoïèse, et la mitogénèse des cellules T. Les effets de l'IL-6 sont médiés par le biais de son récepteur fonctionnel, IL-6R. L'IL-6R est un hétérodimère composé de la chaîne α du IL-6R et d'une sous-unité transductrice du signal gp130, qui est patagée avec l'OSM-R ("Oncostatin-M Receptor"), le LIF-R ("Leukemia Inhibitory Factor Receptor") et le CNTF-R ("Ciliary Neutropic Factor Receptor")

La gp130 est exprimée par un grand nombre de cellules, alors que l'IL-6R α est principalement exprimé par les hépatocytes, les monocytes/macrophages et quelques lymphocytes (Fernandez-Botran *et al.* 1996).

Le récepteur soluble de l'IL-6 (sIL-6R α) seul fixe l'IL-6 avec une faible affinité, mais la présence de la sous-unité transductrice du signal (gp130) résulte en la formation d'un récepteur de haute affinité. Au contraire des autres récepteurs solubles, le complexe

formé entre le sIL-6R α et l'IL-6 est capable d'interagir avec la sous-unité transductrice à la surface des cellules cibles et, est donc biologiquement active. Par conséquent, le sIL-6R α a été observé comme favorisant l'activité biologique de l'IL-6, que ce soit *in vitro* comme *in vivo* (Fernandez-Botran *et al.* 1996). (**Figure 12**)

Bien que les études originales aient montré que le sIL-6R α était généré exclusivement par clivage protéolytique de la chaîne IL-6R α membranaire (Mullberg *et al.* 1993), des ARN messagers issus d'un épissage alternatif et codant pour la forme sécrétée du sIL-6R α ont été décrits ultérieurement dans une grande variété de cellules humaines et de lignées cellulaires (Lust *et al.* 1992; Horiuchi *et al.* 1994). Donc le sIL-6R α se trouve à la fois produit par les deux mécanismes. Les signaux régulant la production de sIL-6R α ne sont pas clairement décrits, mais l'activation cellulaire et plus particulièrement les mitogènes et autres activateurs de la protéine kinase C (PMA), ont été montrés comme augmentant fortement leur production par les cellules hépatiques et lymphoïdes (Mullberg *et al.* 1993; Korholz *et al.* 1994).

Le sIL-6R α est retrouvé dans le sérum et l'urine d'individus sains (Novick *et al.* 1989; Frieling *et al.* 1994). Le taux de sIL-6R α augmente dans de nombreuses conditions cliniques, comme les maladies inflammatoires et les gammopathies monoclonales. La production de sIL-6R α par les lignées cellulaires promyélocytiques et T est augmentée en réponse aux infections par le HTLV-1 ou le VIH, et des taux élevés de sIL-6R α ont été retrouvés chez les patients séropositifs pour le VIH (Honda *et al.* 1992). De tels taux peuvent potentialiser l'activité de l'IL-6 *in vivo*, avec des conséquences plus ou moins délétères, comme une augmentation de la sensibilité des cellules de myélomes à l'IL-6 (Gaillard *et al.* 1993; Greipp 1994). Il a été montré chez la souris que le taux de sIL-6R α sérique augmente graduellement au cours de la grossesse, et les cellules déciduelles ont été identifiées comme la source active de production du sIL-6R α (Maeda *et al.* 1994). De telles observations suggèrent que la potentialisation de l'activité de l'IL-6 *in vivo* doit également jouer un rôle physiologique lors de la gestation.

D'autres conditions cliniques ont été associées à une diminution du taux sérique de sIL-6R α . Les patients atteints d'une sepsis sévère ont un taux d'IL-6 élevé dans le sérum, mais un taux faible de sIL-6R α . De plus, un taux sérique faible de sIL-6R α a été montré chez les patients souffrant de schizophrénie et de polyarthrite rhumatoïde juvénile. La signification clinique de la réduction des taux de sIL-6R α n'est pas claire, mais il semble

que ce soit une réponse du système immunitaire pour réguler négativement l'activité de l'IL-6 dans les conditions où elle est sur-produite (Fernandez-Botran *et al.* 1996).

2. . *T* anssignalisation.

Bien que la plupart des formes solubles de récepteurs de cytokines agissent comme antagonistes en entrant en compétition avec leur forme membranaire pour leur ligand, certains récepteurs solubles sont agonistes. Dans ce cas, le complexe formé du récepteur soluble et de sa cytokine se fixe à la surface des cellules cibles à une autre sous-unité réceptrice qui transmet le signal à la cellule.

Classiquement, la liaison de l'IL-6 à la forme membranaire du IL-6R α engendre le recrutement de 2 molécules membranaires de gp130 formant un complexe IL-6 tétra- ou hexamérique actif (Grotzinger *et al.* 1999). Seul le complexe IL-6/sIL-6R α est capable de fixer les gp130, alors que les molécules individuellement en sont incapables. Au même titre que le système IL-12, le complexe IL-6/sIL-6R α constitue la cytokine active (Gearing and Cosman 1991; Oppmann *et al.* 2000). L'homodimérisation de deux gp130 enclenche la phosphorylation des gp130 et des STATs (STAT1 et 3) par les JAKs (JAK1 et 2, et TYK2) constitutivement associées aux gp130 (Heinrich *et al.* 1998). L'IL-6R α n'est pas impliqué dans la signalisation.

Le complexe IL-6/sIL-6R α peut activer des cellules cibles exprimant des gp130 à leur surface. Ce processus est appelé *transsignalisation* (Rose-John and Heinrich 1994) (**Figure 11A**). Le complexe IL-6/sIL-6R α peut soit potentialiser l'activité de l'IL-6 sur les cellules exprimant IL-6R α membranaire (Mackiewicz *et al.* 1992; Peters *et al.* 1996; Peters *et al.* 1998), soit augmenter le panel de cellules cibles sensibles à l'IL-6 qui sont dépourvues de l'IL-6R α . Les cellules souches embryonnaires, les cellules progénitrices précoces hématopoïétiques, de nombreuses cellules nerveuses, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, entre autre, répondent à l'IL-6 seulement en présence du sIL-6R α (Jones and Rose-John 2002; Rose-John 2003). Le sIL-6R α peut aussi protéger l'IL-6 contre la dégradation protéolytique dans les sites inflammatoires (Bank *et al.* 2000). Néanmoins, l'activité du complexe se trouve limitée par la présence d'une forme soluble de gp130, la sgp130, dans le sérum, qui entre en compétition avec la forme membranaire de gp130 pour le complexe (Muller-Newen *et al.* 1998). Il a été suggéré qu'*in vivo*, le sIL-

6R α jouerait un rôle antagoniste de l'IL-6 en formant un complexe ternaire IL-6, sIL-6R α et sgp130 (Muller-Newen *et al.* 1998). Il a été montré, plus précisément, que la sgp130 inhibe seulement l'effet de l'IL-6 passant par le sIL-6R α , et non celui transmis via la forme gp130 membranaire (Jostock *et al.* 2001).

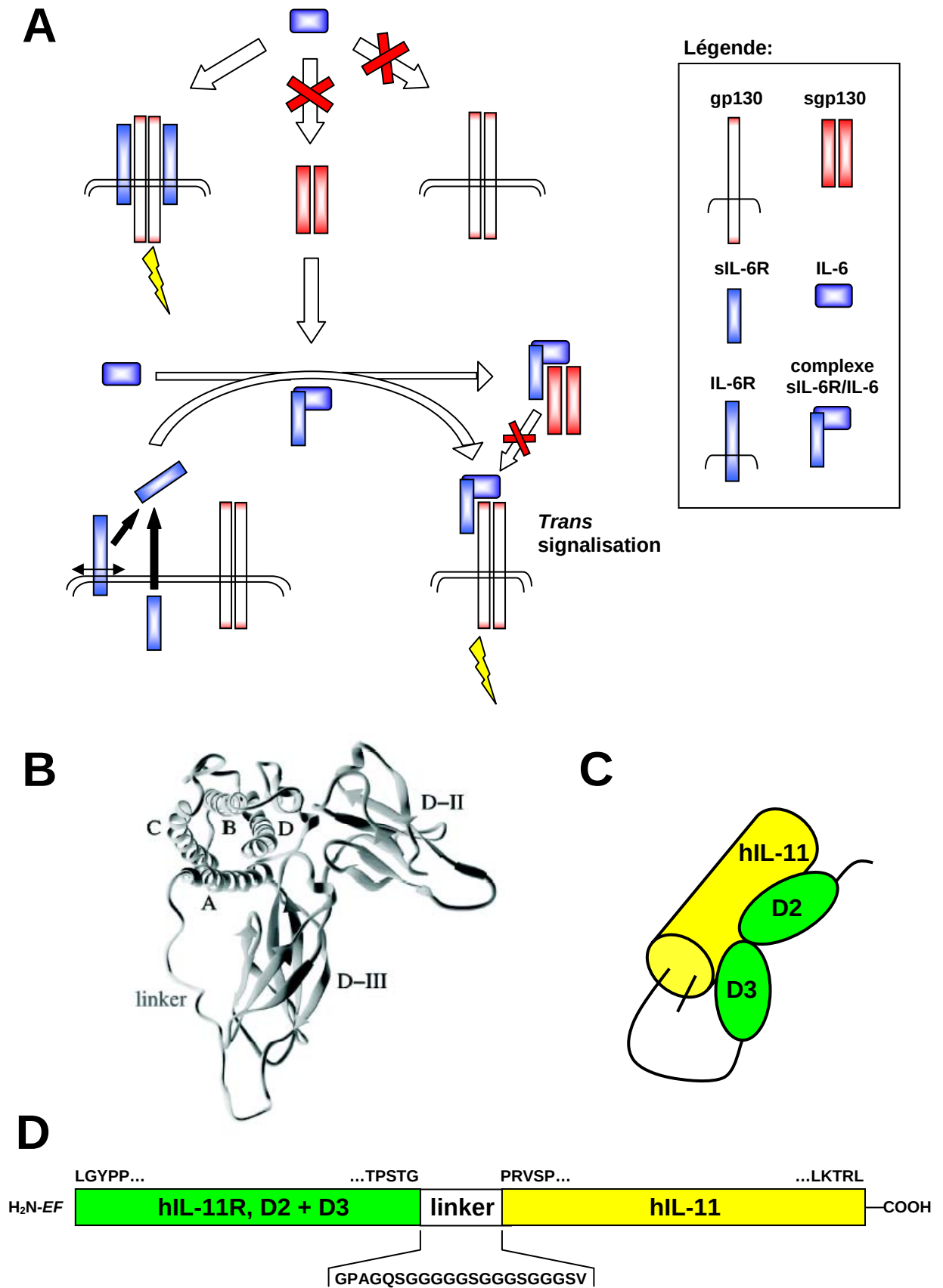
La gp130 soluble est aussi capable d'inhiber l'activité biologique d'autres cytokines qui utilisent au sein de leur complexe récepteur la gp130 (OSM, LIF, et CNTF). Il a récemment été décrit que le CNTF n'agit pas seulement avec le CNTFR membranaire ou soluble mais également avec l'IL-6R α sous ses deux formes (Schuster *et al.* 2003).

L'assemblage du complexe IL-6 possède une capacité propre d'auto-inhibition en réponse à un surplus d'IL-6 comme ce qui a été déjà montré dans le cas de l'insuline (Grotzinger *et al.* 1999). De faibles concentrations en IL-6 et sIL-6R α suggèrent l'induction de formes actives de complexes tétramériques, alors que de fortes concentrations transforment le tétramère en hexamère inactif. De plus, le ratio entre l'IL-6, l'IL-6R α et le nombre de gp130 à la surface des cellules cibles, peut déterminer si la cellule répondra ou non à l'IL-6 (Peters *et al.* 1998).

3. l' Hyper-IL-6.

Une protéine de fusion a été construite entre les domaines de l'IL-6 et du sIL-6R nécessaires à la fonction biologique. Les deux protéines sont liées covalamment par un linker polypeptidique flexible. La protéine recombinante se replie correctement et est biologiquement active. La protéine de fusion, appelée Hyper-IL-6, est 100 à 1000 fois plus active que le mélange d'IL-6 et de sIL-6R α séparé. De nombreuses cellules, comme les cellules progénitrices hématopoïétiques, les cellules neuronales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, qui ne répondent pas à l'IL-6, montrent une forte réponse à l'Hyper-IL-6 (Fischer *et al.* 1997; Renne *et al.* 1998; Jones and Rose-John 2002; Hacker *et al.* 2003) (**Figure 11B**).

Cette approche a aussi été utilisée pour d'autres cytokines. Ainsi, il a été construit une protéine de fusion entre l'IL-11 et un récepteur soluble sIL-11R (Pflanz *et al.* 1999). La protéine de fusion CNTF/sCNTFR a été montrée comme amplifiant l'activité neurotrophique sur les neurones primaires de l'hippocampe (Sun *et al.* 2002) (**Figures 11C, D**).



4. Autres complexes cytokine/récepteur de la famille IL-6.

Le CNTF s'associe à son récepteur soluble sCNTFR pour former un hétérodimère biologiquement actif. Le complexe CNTF/sCNTFR se fixe sur un complexe récepteur formé de gp130 et de la chaîne réceptrice du LIF (LIFR).

CLC peut être sécrété en association avec soit le sCNTFR soit avec un autre homologue de la chaîne α , le CLF-1 ("Cytokine-Like Factor-1"), et forment deux hétérodimères différents. Le complexe CNTFR/CLC est actif sur les cellules exprimant la gp130 et le LIFR, alors que le complexe CLC/CLF-1 nécessite la présence du CNTFR membranaire (Trinchieri *et al.* 2003) (**Figure 12**).

B. La famille IL-12.

1. Caractéristiques.

L'IL-12 est une cytokine hétéro-dimérique composée de deux sous-unités, p35 et p40, liées par deux ponts di-sulfures (Gately *et al.* 1991; Gubler *et al.* 1991; Wolf *et al.* 1991). La sous-unité p40 est homologue aux récepteurs de cytokines, alors que la sous-unité p35 est similaire à l'IL-6 et au G-CSF (Merberg *et al.* 1992). Les gènes codant pour p35 et p40 sont localisés sur deux chromosomes différents, respectivement le 3 et le 5. L'expression protéique de ces sous-unités est régulée de manière indépendante. Quand ces deux sous-unités sont co-exprimées dans la même cellule, elles forment un hétéro-dimère p70 biologiquement actif (Gubler *et al.* 1991) (**Figure 12**).

La p40 peut être produite sous forme de monomères ou d'homodimères (p40₂) en large excès par rapport à l'hétérodimère p70 *in vitro* et *in vivo*. Les homo-dimères de p40 sont antagonistes de p70 chez la souris (Gately *et al.* 1996), mais sont sans effet chez l'homme (Ling *et al.* 1995). La p40 aurait un rôle chimio-attractant pour les macrophages (Ha *et al.* 1999). La p35 n'est, quant à elle, pas sécrétée sous forme monomérique.

2. Les effets biologiques de l'IL-12.

Une des fonctions principales de l'IL-12 est sa capacité à induire d'autres cytokines, en particulier l'IFN γ par les cellules T et NK. L'IFN γ stimule l'activité bactéricide des cellules phagocytaires, ce qui amplifie la réponse immune innée. La production d'IFN γ induite par l'IL-12 dans les cellules T, B et NK, est amplifiée par l'IL-18 en synergie. L'IL-12 entraîne une augmentation du taux d'expression du IL-18R. L'IL-12, en particulier avec l'IL-18, peut induire la production d'IFN γ par les CPA. De plus l'IL-12 amplifie l'activité cytolytique des cellules NK et T (Watford *et al.* 2003).

La principale fonction de l'IL-12 est sa régulation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules Th1 produisent de l'IFN γ et assurent l'immunité à médiation cellulaire, qui est essentielle pour la réponse contre les pathogènes intra-cellulaires. L'IL-12 est la cytokine principale régulant la différenciation Th1 et présente de nombreuses fonctions pour promouvoir l'immunité à médiation cellulaire (Dong and Flavell 2001; O'Shea *et al.* 2002; O'Shea and Paul 2002). L'IL-12 et l'IFN γ ont une action antagoniste sur la différenciation Th2 et la production d'IL-4, IL-5 et IL-13.

3. Structure du récepteur de l'IL-12.

Le récepteur de l'IL-12 est constitué de deux sous-unités, $\beta 1$ et $\beta 2$, qui sont structurellement proches de la superfamille des récepteurs de cytokines de type I et sont homologues à la chaîne gp130 (Chua *et al.* 1994; Chua *et al.* 1995; Presky *et al.* 1996). L'affinité de l'IL-12 pour chaque sous-unité seule est faible, et la co-expression de $\beta 1$ et $\beta 2$ est nécessaire pour la formation d'un récepteur de haute affinité (Presky *et al.* 1996). La p40 de l'IL-12 interagit avec la sous-unité $\beta 1$, et la p35, principalement, avec $\beta 2$. La sous-unité $\beta 2$ est la chaîne transductrice du récepteur de l'IL-12. La sous-unité $\beta 1$ apparaît plus importante pour la liaison de l'IL-12. Elle ne semble pas dotée d'activité transductrice et ne possède pas de résidus tyrosine intracellulaire (**Figure 12**).

4. L'IL-23 et l'IL-27.

La sous-unité p40 de l'IL-12 peut s'apparier avec une deuxième sous-unité, p19, qui possède des homologies avec p35, IL-6 et G-CSF. Les produits bactériens induisent la production de p19 par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T et les

cellules endothéliales. La sous-unité p19 requiert la co-expression de p40 pour sa sécrétion, associées, elles forment une nouvelle cytokine, l'IL-23 (Oppmann *et al.* 2000). Comme l'IL-12, l'IL-23 active la production d'IFN γ par les cellules dendritiques et les cellules T (Belladonna *et al.* 2002). Une fonction propre à l'IL-23 est d'assurer la prolifération de cellules T mémoires (Oppmann *et al.* 2000). L'IL-23 lie un récepteur composé de l'IL-12R β 1 et une deuxième chaîne, IL-23R (Parham *et al.* 2002). Le gène de l'IL-23R est localisé à 150kb de celui de l'IL-12R β 2 sur le chromosome 1 (**Figure 12**).

L'IL-27 est une nouvelle cytokine hétérodimérique identifiée composée de l'EBI3 ("Epstein-Barr virus-induced gene 3") et une nouvelle sous-unité, p28 (Pflanz *et al.* 2002). La p28 est homologue à la sous-unité p35, et EBI3 est proche de p40 et ressemble à un récepteur soluble (Devergne *et al.* 1997). La co-expression des deux-unités est nécessaire pour une sécrétion efficace d'IL-27. La production d'IL-27 est restreinte aux cellules myéloïdes avec des niveaux élevés d'expression dans les monocytes et les cellules dendritiques activés par le LPS. L'IL-27 induit préférentiellement la prolifération des lymphocytes T naïfs, mais pas des mémoires, en combinaison avec l'engagement du TCR (Pflanz *et al.* 2002). L'IL-27 agit seul ou en synergie avec l'IL-12 sur la production d'IFN γ et donc joue un rôle dans la polarisation Th1. L'IL-27 lie un récepteur WSX-1 / TCCR, un autre récepteur possédant des homologies avec la gp130 (Chen *et al.* 2000; Yoshida *et al.* 2001). Le WSX-1 est exprimé principalement sur les lymphocytes T. Le WSX-1 apparaît nécessaire, mais non suffisant pour la signalisation de l'IL-27. Une seconde sous-unité transductrice différente des chaînes β 1 et β 2 est impliquée dans la signalisation. Il s'agit de la gp130 (Pflanz *et al.* 2004) (**Figure 12**).

- 91 -

V. Les récepteurs solubles de cytokines en thérapie.

Les cytokines constituent des cibles intéressantes pour des approches thérapeutiques, du fait de leurs implications fondamentales dans l'établissement de nombreuses pathologies. Les différentes formes solubles de récepteurs sont impliquées dans la régulation endogène de l'activité cytokinique. Ces récepteurs solubles présentent de nombreux avantages comme leur spécificité, leur haute affinité et leur faible immunogénicité, et peuvent ainsi constituer des agents thérapeutiques d'intérêt.

A. Récepteurs solubles comme agents thérapeutiques.

L'aptitude des récepteurs solubles à spécifiquement lier et inhiber l'effet biologique de leur cytokine est à la base de l'intérêt porté pour leur utilisation en thérapie, avec cependant des avantages et des inconvénients.

1. Avantages.

L'avantage certain de l'utilisation des récepteurs solubles par rapport à d'autres médicaments est leur haute spécificité, permettant de ne pas affecter les autres cytokines. Cette thérapie par récepteurs solubles permet de mieux préserver l'immunocompétence de l'hôte contrairement aux médicaments immunosuppresseurs peu spécifiques. Un autre avantage présenté par la majorité des récepteurs solubles est leur haute affinité pour leur ligand, faisant d'eux de puissants inhibiteurs. Comme les récepteurs solubles naturels dérivent de molécules endogènes, ils ne sont pas immunogènes, ce qui évite le développement d'une réponse humorale par l'hôte. De plus, il a été montré que les récepteurs solubles étaient faiblement toxiques pour l'organisme (Fernandez-Botran *et al.* 2002).

2. Inconvénients.

Les récepteurs montrent tout de même certaines limites quant à leur utilisation comme agents immunothérapeutiques. Les cytokines sont impliquées dans de nombreuses manifestations pathologiques dans différents types de maladies, et leur production et leur sécrétion sont souvent la résultante de causes sus-jacentes. Donc, les récepteurs solubles ne vont pas nécessairement agir à la source de la maladie. Les récepteurs solubles présentent, également, une demi vie courte de l'ordre de quelques heures (Jacobs *et al.* 1991). Pour pallier ce problème, des protéines de fusion ont été construites entre le récepteur et la partie Fc d'une immunoglobuline ou par l'addition de molécules de PEG ("Polyéthylène Glycol") (Kurschner *et al.* 1992; Mohler *et al.* 1993; Richter *et al.* 1999). De plus, à cause de leur nature protéique, les récepteurs solubles sont les cibles de nombreuses protéases et nécessitent des conditions de stockage spéciales et ne peuvent pas être administrés oralement. Enfin, une limite supplémentaire est la dissociation du complexe cytokine/récepteur surtout si le récepteur soluble n'est pas en concentration suffisante.

B. Utilisation clinique et applications.

a) Maladies inflammatoires.

Les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans de nombreuses manifestations pathologiques de maladies inflammatoires aiguës et chroniques (polyarthrite rhumatoïde, sclérose multiple, maladie inflammatoire de l'intestin). Une approche thérapeutique consiste à bloquer l'activité de ces cytokines, en particulier en haut de la cascade inflammatoire, comme le TNF α et l'IL-1 (Akira *et al.* 1990; Dayer and Burger 1994; Aderka 1996). L'inhibition du TNF α par le sTNFR ou des anticorps représente une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de ces maladies inflammatoires (Fernandez-Botran 1999). En effet, l'agent thérapeutique le plus avancé en terme de développement clinique est le Etanercept (Enbrel; Immunex) (Mohler *et al.* 1993) qui est formé de la fusion entre le récepteur soluble du TNF de type II avec un fragment Fc d'une IgG1 humaine. Cet antagoniste du TNF α est le premier récepteur soluble à avoir été utilisé chez l'homme.

b) Asthmes et allergies.

Les allergies sont liées à l'activation et la prolifération anormalement élevée des cellules Th2 et à l'action des cytokines produites par ces cellules, en particulier l'IL-4. En effet, l'IL-4 est essentiel à la production des anticorps IgE par les mastocytes (Pauwels *et al.* 1998). L'IL-5 et à un degré moindre, l'IL-3 et le GM-CSF, sont impliqués dans l'activation des éosinophiles chez les patients atteints d'asthme.

c) Régulations immunitaires.

La différenciation des cellules T CD4, en Th1 ou Th2, est régulée par différentes cytokines. L'IL-12, l'IFN γ et l'IL-18 assurent la différenciation des cellules T CD4 en Th1, alors que l'IL-4, l'IL-10 et le TGF β dirigent les cellules vers la voie Th2 (Romagnani 2000). Il est possible de moduler la différenciation des cellules T CD4 *in vivo* en inhibant l'un ou l'autre groupe de cytokines. De telles applications sont prometteuses pour le traitement des maladies inflammatoires et infectieuses.

d) Facteurs de croissance autocrine pour les cellules tumorales.

Plusieurs cytokines sont connues pour assurer la prolifération autocrine des cellules malignes, comme l'IL-6 pour le myélome multiple (Taga and Kishimoto 1997) ou encore, l'IL-2 pour la leucémie à lymphocytes T (Rubin and Nelson 1990). L'inhibition de ces cytokines pourrait permettre de limiter et contrôler la croissance de la population cellulaire tumorale.

C. Observations cliniques.

Il est nécessaire de prendre en considération la redondance fonctionnelle des cytokines. Ainsi, plusieurs cytokines peuvent avoir des effets biologiques similaires (Fernandez-Botran 1999). De plus, les cytokines n'agissent pas isolées mais plutôt en cascades cytokiniques. Donc, l'inhibition d'une seule cytokine n'est pas nécessairement

suffisante pour modifier l'avancée de la maladie. Il est donc préférable d'inhiber la cascade de cytokine au niveau de son origine (TNF α pour le traitement des maladies inflammatoires) ou de cibler des cytokines qui possèdent une activité très spécifique (IL-4 pour la production d'IgE par les mastocytes).

L'analyse des effets secondaires rencontrés lors de l'utilisation du sTNFR pour soigner la sepsie sévère, a permis de montrer que le fait d'inhiber d'une cytokine particulière pour prévenir de son effet pathogène peut engendrer une réaction de l'hôte et altérer ses défenses contre d'autres infections ou maladies. Ainsi exemple, l'inhibition du TNF α abroge l'effet pro-inflammatoire associé à cette cytokine, mais en revanche augmente la sensibilité de l'hôte aux infections. De même, l'inhibition de l'IL-4 réduit l'asthme et les allergies, mais favorise le développement de maladies autoimmunes en altérant la balance Th1/Th2 physiologique (Fernandez-Botran *et al.* 2002).

Application	Récepteurs solubles de cytokines
Maladies inflammatoires	sTNFR-I et sTNFR-II sIL-1R-I et sIL-1R-II sgp130 IL-18-BP
Asthme et allergies	sIL-4R sIL-5R sIL-13R
Modulation de la différenciation Th1/Th2	pro Th1 sIL-4R sIL-10R pro Th2 sIFN γ sIL-12R IL-18-BP
Croissance autocrine des cellules tumorales	sIL-1R-I et sIL-1R-II sIL-2R sgp130

Tableau 2 : Récepteurs Solubles et leurs Applications.

RÉSULTATS

AVANT PROPOS

Cette étude est scindée en trois parties incluant deux articles, l'un publié dans le *Journal of Immunology*, et le second en soumission dans le *Journal of Biological Chemistry*.

Dans la première étude, nous avons mis en évidence une forme soluble naturelle de la chaîne α de l'IL-15R (sIL-15R α) issue d'une coupure protéolytique de la forme membranaire. Le sIL-15R α présente des propriétés fortement inhibitrices de l'action de l'IL-15 (Article I).

Nous avons ensuite étudié les propriétés agonistes d'une forme soluble recombinante du domaine sushi de fixation de l'IL-15 (sIL-15R α -sushi), sur les cellules exprimant les chaînes réceptrices IL-2R β et γ_c . Afin d'optimiser cet effet agoniste, nous avons construit des protéines de fusion constituées d'une molécule d'IL-15 liée, grâce à un linker flexible, à une molécule de sIL-15R α -sushi (Article II).

L'IL-15 est une cytokine fortement régulée et n'est détectable que dans certains cas pathologiques. Dans la troisième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés, en particulier, à la maladie de Crohn (MC), une maladie inflammatoire de l'intestin. La MC présente, dans sa phase aiguë, des taux relativement élevés d'IL-15. Au cours de cette étude préliminaire, nous avons mis en évidence l'existence du sIL-15R α *in vivo* chez les patients atteints de MC, notamment lors du traitement des patients par des anticorps anti-TNF α (Rémicade[®]).

I. Mise en évidence d'une forme soluble de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-15.

A. Résumé.

L'IL-15 et l'IL-2 sont deux cytokines très proches structurellement et fonctionnellement. Leurs récepteurs de haute affinité partagent les chaînes réceptrices IL-2R β et γ_c , et leurs spécificités de réponse sont conférées par des chaînes α privées, IL-15R α et IL-2R α . Bien que l'action de l'IL-2 semble restreinte à la réponse adaptative T, l'IL-15 apparaît cruciale dans la réponse immunitaire innée. De plus, l'expression ubiquitaire de l'IL-15 et de sa chaîne IL-15R α montre que ce système semble avoir de multiples rôles dans différents tissus et types cellulaires. À l'aide d'une méthode de dosage sensible, nous avons montré l'existence d'une forme soluble de la chaîne α du récepteur de l'IL-15, sIL-15R α . Cette forme est issue d'un clivage protéolytique constitutif de la forme membranaire de la chaîne IL-15R α à la surface de différentes lignées cellulaires ou de COS-7 transfectées avec l'ADNc codant pour la forme totale de la chaîne IL-15R α . Cette libération est fortement augmentée après l'action de la PMA et de la ionomycine, et également, mais à un niveau plus faible, après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β et TNF α . L'analyse des mutants de l'ectodomaine de l'IL-15R α et la taille de la forme soluble (42 kDa), rendent compte de l'existence de différents sites de clivage à proximité de la membrane plasmique. La coupure protéolytique induite par la PMA est abrogée après action d'un inhibiteur de metalloprotéases de la matrice, le GM6001. Ce dernier est sans effet sur le clivage constitutif, ce qui suggère l'existence de deux mécanismes distincts de protéolyse. Le sIL-15R α lie avec une forte affinité l'IL-15. Il exerce une action inhibitrice sur la fixation de l'IL-15 sur sa chaîne réceptrice ainsi que sur la prolifération cellulaire dépendante de l'IL-15. Ces résultats suggèrent que la coupure protéolytique de la forme membranaire de l'IL-15R α et la libération de la forme soluble, jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire.

B. Introduction.

De nombreux récepteurs solubles de cytokines ont été décrits et correspondent à la partie extra-cellulaire du récepteur membranaire. Ces récepteurs solubles sont retrouvés dans les surnageants de culture et dans certains liquides biologiques humains et murins.

L'IL-2 et IL-15 sont deux cytokines proches ayant des effets biologiques similaires *in vitro*. Cette redondance s'explique par le fait qu'elle possèdent des chaînes réceptrices transductrices en commun, IL-2R β et γ_c (Giri *et al.* 1995). Leur spécificité est conférée par leur chaîne α privée. Une forme soluble de la chaîne α du récepteur de l'IL-2, sIL-2R α , a été mise en évidence. Cette forme est issue d'un clivage protéolytique à la surface des lymphocytes T activés. Ce mécanisme participe à la régulation négative de l'activation lymphocytaire T en diminuant le niveau d'expression de la chaîne IL-2R α membranaire. De plus le sIL-2R α agit en tant qu'antagoniste de l'action de l'IL-2 (Nelson and Willerford 1998). Cependant, cette chaîne soluble, comme la chaîne membranaire, lie l'IL-2 avec une faible affinité et donc, de fortes concentrations sont nécessaires pour neutraliser l'effet de l'IL-2 *in vitro* (Jacques *et al.* 1987). Une étude récente a montré que le clivage protéolytique de la forme membranaire de l'IL-2R α , à la surface des lymphocytes T, peut être induit par des métalloprotéases (MMPs) dérivées de tumeurs et ainsi supprime la capacité proliférative des cellules T (Sheu *et al.* 2001).

Le but initial de mon sujet de thèse était de rechercher si, à l'instar de ce qui avait été décrit pour le système IL-2, une forme soluble de la chaîne spécifique du récepteur à l'IL-15 pouvait exister, et quelles étaient ses caractéristiques moléculaires et fonctionnelles. Une telle forme soluble devait, si elle conservait la haute affinité de la forme membranaire, constituer une molécule régulatrice importante et efficace.

C. Résultats.

Nos travaux ont effectivement conduit à l'identification d'une telle forme soluble (sIL-15R α). Nous avons tout d'abord mis en évidence l'existence de cette forme soluble à l'aide de cellules COS-7 transfectées avec l'ADN complémentaire codant pour la forme membranaire de l'IL-15R α . Après traitement des cellules à la PMA, l'expression de la

chaîne IL-15R α est diminuée. Afin de voir si la diminution de l'expression de l'IL-15R α à la surface des cellules était corrélée avec une apparition d'une forme soluble de la chaîne IL-15R α dans les surnageants de culture, nous avons mis au point une technique RIA sensible, avec une limite de détection de 1 pM. Ce RIA permet la détection du sIL-15R α "libre", c'est-à-dire, non lié à une molécule d'IL-15 dans les surnageants de culture de COS-7 transfectées. Cette forme est également produite naturellement par les cellules exprimant la forme membranaire du récepteur, notamment de nombreuses cellules tumorales telles les A172 (lignée de glioblastome), les TF-1 (lignée érythroleucémique), et les Kit 225 (lignée de lymphome T). La production de sIL-15R α , bien que constitutive, peut être accrue par divers stimuli, comme la PMA, la ionomycine et, à un moindre degré, par le TNF α , ou l'IL-1 β .

Par ailleurs, nos travaux ont montré que le sIL-15R α était issu d'un mécanisme de protéolyse. Plusieurs informations vont dans ce sens: (i) différents transcrits issus d'un épissage alternatif de l'ARN messager ont été décrits dans la littérature, mais aucun ne code pour une forme soluble du IL-15R α , (ii) la stimulation de la production du récepteur soluble dans les surnageants de culture est corrélée avec une diminution de l'expression de l'IL-15R α à la surface des cellules, (iii) après transfection de cellules COS-7 avec le plasmide codant pour la forme totale du récepteur, ces cellules libèrent dans leur surnageant un sIL-15R α de masse moléculaire de 42 kDa, 13 kDa plus faible que celle du IL-15R α membranaire. Des formes solubles de récepteur de l'IL-15 de même masse moléculaire (environ 42 kDa) ont aussi été observées dans des surnageants des différentes lignées cellulaires tumorales humaines étudiées. Enfin, (iv) la production de sIL-15R α induite par la PMA est bloquée par le GM6001, un inhibiteur de synthèse des métalloprotéases, alors que des inhibiteurs d'autres types de protéases sont sans effet. Le GM6001 bloque la production de sIL-15R α induite par la PMA, bien que la libération constitutive de sIL-15R α ne soit pas affectée. Ainsi, deux mécanismes apparaissent impliqués dans la génération du sIL-15R α , dont un fait intervenir les métalloprotéases.

Par cross-linking, nous avons observé que la masse moléculaire du sIL-15R α était d'environ 42 kDa. Ceci nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le site de coupure protéolytique devait se situer près de la membrane plasmique. Afin de déterminer le domaine de la protéine impliqué, nous avons construit différentes formes membranaires de la chaîne IL-15R α . Malgré la délétion des domaines 3, 4 ou 5 de la chaîne IL-15R α membranaire, une forme soluble de la chaîne IL-15R α a toujours été détectée dans les

survivant cellulaire. De plus, le traitement à la PMA augmente le niveau d'expression de ces formes solubles dans le surnageant de culture de ces cellules.

Le sIL-15R α fixe l'IL-15 avec une forte affinité ($K_d = 166$ pM) et est capable, à de faibles concentrations, de l'ordre du picomolaire, de bloquer spécifiquement l'interaction de l'IL-15 avec son récepteur membranaire de haute affinité, et d'inhiber la prolifération cellulaire induite par l'IL-15. Ainsi, le sIL-15R α identifié est un régulateur potentiel très efficace de l'action de l'IL-15. De par sa forte activité antagoniste, le sIL-15R α est un candidat potentiel pour des applications thérapeutiques. Des études précliniques chez la souris ont déjà montré l'intérêt de formes solubles recombinantes d'IL-15R α (Ruchatz *et al.* 1998; Smith *et al.* 2000).

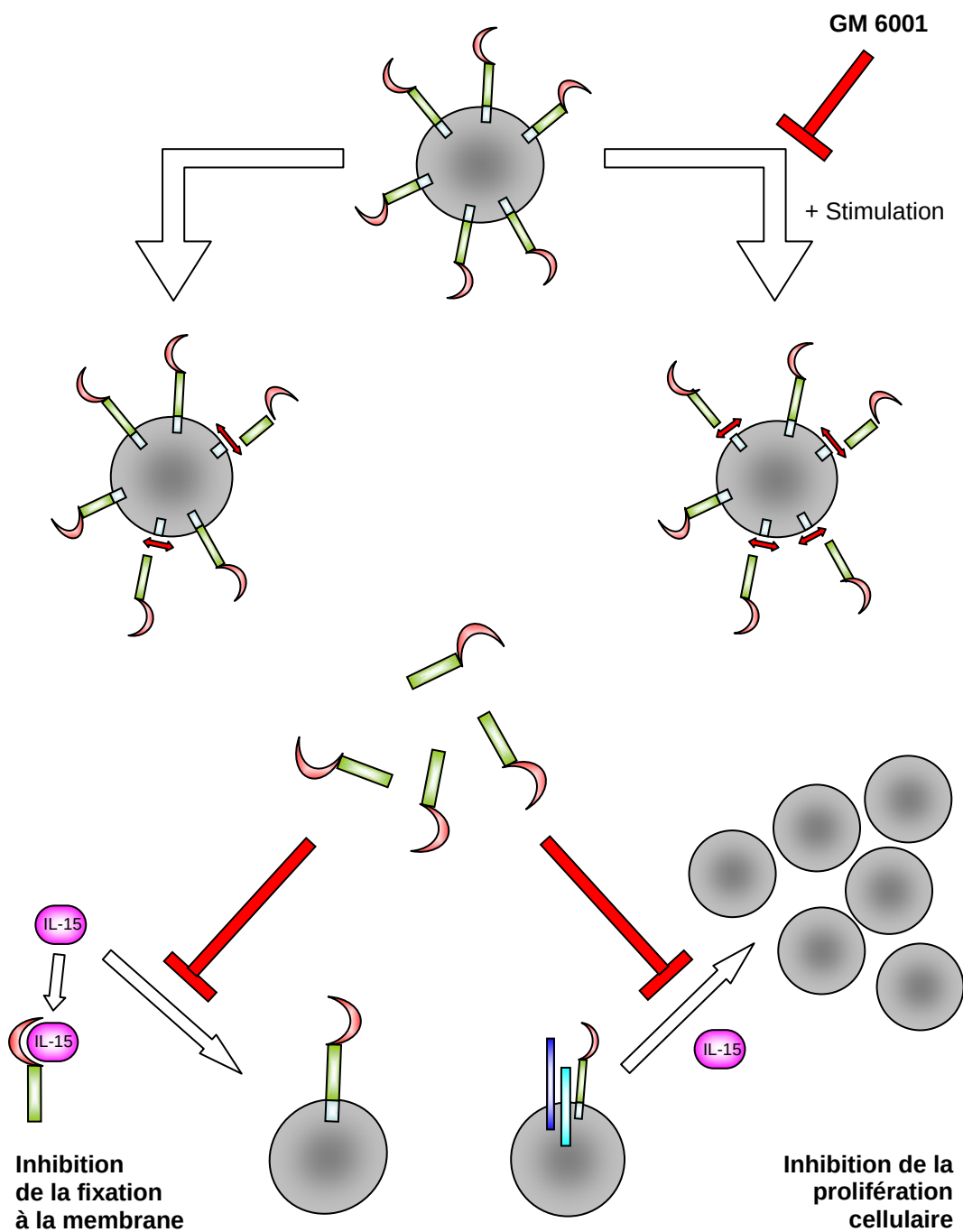


Figure 13 : Schéma Récapitulatif de la Mise en Evidence du sIL-15R α Généré par Coupure Protéolytique et son Action sur la Fixation Membranaire et la Prolifération Cellulaire.

D. Article I.

Natural, Proteolytic Release of a Soluble Form of Human IL-15 Receptor α -Chain That Behaves as a Specific, High Affinity IL-15 Antagonist.

(Mortier E. *et al.*, (2004) *J. Immunol.* 173 : 1681-1688)

Natural, Proteolytic Release of a Soluble Form of Human IL-15 Receptor α -Chain That Behaves as a Specific, High Affinity IL-15 Antagonist¹

Erwan Mortier, Jérôme Bernard, Ariane Plet, and Yannick Jacques²

IL-15 and IL-2 are two structurally and functionally related cytokines whose high affinity receptors share the IL-2R β -chain and γ -chain in association with IL-15R α -chain (IL-15R α) or IL-2R α -chain, respectively. Whereas IL-2 action seems restricted to the adaptative T cells, IL-15 appears to be crucial for the function of the innate immune responses, and the pleiotropic expression of IL-15 and IL-15R α hints at a much broader role for the IL-15 system in multiple cell types and tissues. In this report, using a highly sensitive radioimmunoassay, we show the existence of a soluble form of human IL-15R α (sIL-15R α) that arises from proteolytic shedding of the membrane-anchored receptor. This soluble receptor is spontaneously released from IL-15R α -expressing human cell lines as well as from IL-15R α transfected COS-7 cells. This release is strongly induced by PMA and ionomycin, and to a lesser extent by IL-1 β and TNF- α . The size of sIL-15R α (42 kDa), together with the analysis of deletion mutants in the ectodomain of IL-15R α , indicates the existence of cleavage sites that are proximal to the plasma membrane. Whereas shedding induced by PMA was abrogated by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor GM6001, the spontaneous shedding was not, indicating the occurrence of at least two distinct proteolytic mechanisms. The sIL-15R α displayed high affinity for IL-15 and behaved as a potent and specific inhibitor of IL-15 binding to the membrane receptor, and of IL-15-induced cell proliferation (IC₅₀ in the range from 3 to 20 pM). These results suggest that IL-15R α shedding may play important immunoregulatory functions. *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 1681–1688.

Many soluble cytokine receptors have been described that correspond to the extracellular portions of their full-length transmembrane receptor counterparts. These soluble receptors are found in cell culture supernatants and in body fluids of humans and mice. They have been shown to keep their ligand binding capacities and therefore to be potential regulators of the biological functions of cytokines. They can either function as natural antagonists (e.g., IL-2R α , IL-4R, LIF-R), biological agonists (e.g., IL-6R, CNTF-R), carrier molecules (e.g., IL-4R), or chaperones to protect their ligands from proteolytic degradation (1). Two major mechanisms responsible for the generation of these soluble receptors have been identified. The first is related to alternative gene splicing leading to the synthesis of mRNAs that encode soluble, truncated receptors lacking the intracellular and transmembrane domains. The second is the proteolytic cleavage of the extracellular domain of membrane-anchored receptors, mostly by metalloproteinases (2, 3).

IL-15 and IL-2 are two structurally related cytokines that belong to the four α helix bundle family (4). They elicit similar biological effects in vitro, a redundancy that is explained by the common usage within their functional high affinity receptors of the IL-2R $\beta\gamma$ signaling complex (5). Cytokine specificity is conferred by additional private chains, IL-2R α -chain and IL-15R α -chain (IL-15R α),³ which are structurally related (6). These two chains contain structural domains (called sushi domains) previously found in some complement and adhesion molecules (7). IL-2R α -chain contains two such domains, whereas IL-15R α contains only one. One noticeable difference is that IL-2 binds to IL-2R α -chain with an affinity (K_d = 10 nM) far lower than IL-15 to IL-15R α (K_d = 0.05 nM). Due to the sharing of the $\beta\gamma$ complex, both cytokines trigger similar downstream signaling pathways including activation of Jak-1/Jak-3 tyrosine kinases and subsequent nuclear translocation of the phosphorylated Stat-3 and Stat-5, activation of Lck and Syk tyrosine kinases, activation of the MAPK pathway, and induction of Bcl-2 (8, 9).

Soluble forms of the IL-2R components have been described. The soluble IL-2R α -chain is naturally released by proteolytic shedding from activated T cells and this shedding may represent a mechanism that participate to the down-regulation of lymphocyte activation, by decreasing the level of cell surface IL-2R α -chain and subsequent lymphocyte sensitivity to the action of IL-2, and by acting as a soluble antagonist of IL-2 action (10). The soluble IL-2R α -chain is however, like its membrane counterpart, a low affinity receptor for IL-2 and high concentrations are required to exert a neutralizing effect in vitro (11). Proteolytic cleavage of IL-2R α -chain is also a mechanism used to bias the immune response. For example, it has been shown that the cysteine protease Der p1, a major mite allergen, can cleave IL-2R α -chain from the

Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs en Immunologie et Canc rologie, Département de Canc rologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 601, Institut de Biologie, Nantes, France

Received for publication February 11, 2004. Accepted for publication May 10, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grants P003/5692 and A03/1/3311 from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Centre National de la Recherche Scientifique. E.M. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies. J.B. is a recipient of a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer (L.N.C.C., Comité de Vendée).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Yannick Jacques, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs en Immunologie et Cancérologie, Département de Cancérologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 601, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail address: yjacques@nantes.inserm.fr

³ Abbreviations used in this paper: IL-15R α , IL-15R α -chain; sIL-15R α , soluble IL-15R α ; MMP, matrix metalloproteinase; RIA, radioimmunoassay.

- 105 -

Cross-linking

Affinity cross-linking of radio-iodinated human rIL-15 to cell surface IL-15R   (TF-1 cells) or sIL-15R   purified from supernatants of various cells was conducted using the homobifunctional cross-linker ethylene-glycol-bis-succinimidylsuccinate (EGS; Sigma-Aldrich) following the protocol of the manufacturer. The cross-link complexes were separated on a 10% SDS polyacrylamide gel, and visualized by autoradiography (PhosphorImager 445 SI; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Proliferation assays

The proliferative responses of Kit 225 and 32D  R cells to IL-15 and the inhibitory activity of sIL-15R   on these responses were measured by [³H]thymidine incorporation. Cells were maintained in culture medium for 3 days, washed twice, and starved for 2 h in medium without cytokine. They were then seeded in multiwell plates at 10⁴ cells/well in 100   l and cultured for 48 h in medium supplemented with a fixed concentration of human rIL-15 or human rIL-2 and increasing concentrations of sIL-15R  , or in medium supplemented with a fixed concentration of sIL-15R   and increasing concentrations of human rIL-15. Cells were pulsed for 16 h with 0.5   Ci/well of [³H]thymidine, harvested onto glass fiber filters, and cell-associated radioactivity was measured.

Results

Release of sIL-15R   from the surface of IL-15R  -positive cells

The phorbol ester PMA has been shown to induce the shedding of different cytokine receptors like the IL-6R (24). As a first mean to analyze whether IL-15R   could be similarly regulated, COS-7 cells transfected with a cDNA encoding full-length human IL-15R   (COS-IL-15R  ) were submitted to PMA treatment and their IL-15R   cell surface expression analyzed by flow cytometry using the anti-human IL-15R   mAb M161. As shown in Fig. 1, PMA treatment induced a reduction of this labeling. COS-7 cells transfected with empty vector, treated or not with PMA, were negative. A172 is a human glioblastoma cell line that expresses membrane IL-15R   constitutively. PMA treatment of A172 also resulted in a decrease of its cell surface labeling with M161 (Fig. 1). This effect was time-dependent, with a maximal effect achieved at about 1 h PMA treatment (data not shown).

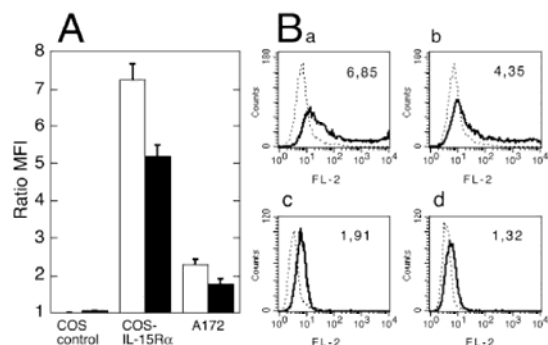


FIGURE 1. Effect of PMA on IL-15R   cell surface expression. *A*, Cells (as indicated) were cultured in the presence (  ) or absence (  ) of PMA (100 ng/ml). IL-15R   expression was measured by flow cytometry using the monoclonal mouse anti-human IL-15R   M161. In ordinates are shown the ratios of the mean of fluorescence intensity (MFI) of the M161 mAb divided by the MFI of an isotype control mouse IgG. Data represent means and error bars represent SE from three independent experiments. *B*, Representative histograms of one of the three experiments. Staining with the anti-human IL-15R   M161 is shown as unbroken lines, whereas control staining with isotype matched IgG is represented by dotted lines. Transfected COS-7 cells and A172 were incubated in the absence (*Ba* and *Bc*, respectively) or presence (*Bb* and *Bd*, respectively) of 100 ng/ml PMA for 1 h. Values shown in inset of each panel represent the (M161 per control mAb) MFI ratios.

We next analyzed whether this decrease in IL-15R   cell surface expression was accompanied by the appearance in the culture supernatants of a sIL-15R   (Fig. 2). For that purpose, a "sandwich" RIA was set up that used the polyclonal anti-IL-15R   Ab AF247 as capture, and radio-iodinated M161 mAb as tracer. When calibrated with a purified recombinant form of human IL-15R   (IL-15R  -IL-2 fusion protein), this RIA gave a linear response up to an IL-15R  -IL-2 concentration of 500 pM and with a sensitivity of ~1 pM (Fig. 2A). In contrast to supernatants of COS-7 transfected with empty vector that were always negative in the RIA (data not shown), supernatants of COS-IL-15R   cells became reactive in the RIA with time of culture after transfection (Fig. 2B), and treatment with PMA increased the kinetic and level of reactivity. The calcium ionophore ionomycin also increased the release of sIL-15R   by transfected COS-7 cells. The effects of both PMA and ionomycin were concentration dependent (Fig. 2C), with half-maximal effects observed at 70 ng/ml and 100 ng/ml, respectively. In addition to PMA and ionomycin, IL-1   and TNF-   were also found to dose dependently increase the level of sIL-15R   in A172 cells supernatants (Fig. 2D) and transfected COS-7 cells supernatants (data not shown).

Crude supernatants collected from unstimulated A172 cells contained sIL-15R   levels (1 pM) that were at the limit of detection by the RIA, and lower than those measured (35 pM) in supernatants from unstimulated transfected COS-7 cells. This could be linked to the fact that A172 cells express lower cell surface IL-15R   than do transfected COS-7 cells (Fig. 1). To increase the sensitivity of detection, cell supernatants (200 ml) were purified and concentrated by immunoaffinity on a column coupled with the M161 mAb. No RIA positivity was found in the fractions eluted

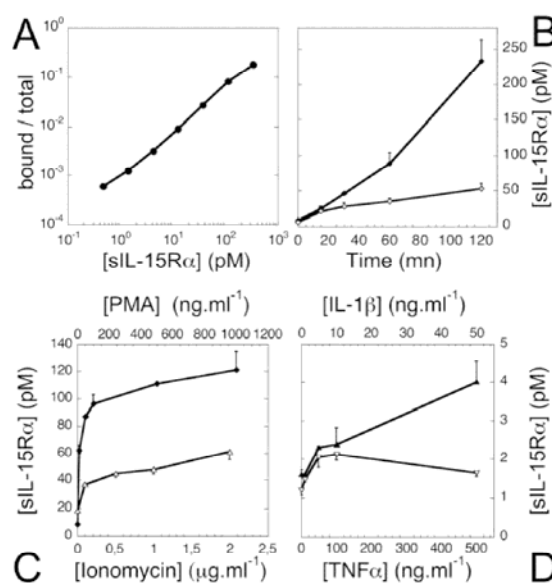


FIGURE 2. Kinetics of sIL-15R   release in cell supernatants. Effects of PMA, ionomycin, IL-1  , and TNF-   are shown. *A*, RIA titration curve is determined with the recombinant sIL-15R   standard as described in *Materials and Methods*. *B*, Kinetics of sIL-15R   release in COS-IL-15R   cells supernatants, in the presence (  ) or absence (  ) of PMA (100 ng/ml). *C*, Dose-dependent effects of PMA (  ) and ionomycin (  ) on sIL-15R   release in COS-IL-15R   cells supernatant for 1 h. *D*, Dose-dependent effects of IL-1   (  ) and TNF-   (  ) on sIL-15R   in A172 cells supernatant for 12 h. Data represent means and error bars represent SE from two independent experiments.

from the supernatant of the U-937 cell line that is IL-15R α negative by flow cytometry with the M161 mAb, as shown in Table I (25–27). By contrast, supernatants from the four IL-15R α positive cell lines A172, TF-1, Kit 225, and TF-1 β , all contained RIA-positive material (Table I). Thus, sIL-15R α release was correlated with IL-15R α cell surface expression, whether or not the cell lines examined expressed IL-2R β and/or IL-2R γ .

Biochemical characterization of sIL-15R α

To determine the molecular mass of the sIL-15R α shed from the different cell lines, the immunopurified fractions were incubated with iodinated IL-15 and the mixture subjected to chemical cross-linking (Fig. 3). No cross-linking was seen with supernatants from COS-7 cells transfected with empty vector (data not shown). With material purified from COS-IL-15R α cells, a broad cross-linked band at ~55 kDa was observed that corresponded to the cross-linking of one molecule of IL-15 (13 kDa) with a receptor molecule of 42 kDa. A cross-linked band at about the same mass was obtained with supernatants of COS-7 cells transfected with a cDNA encoding the extracellular domain of IL-15R α (COS-sIL-15R α), suggesting that the shedding from IL-15R α transfected COS-7 cells occurred via cleavage of the membrane receptor at a site proximal to the cell membrane. IL-15 cross-linked bands of similar masses (~55 kDa) were also found with supernatants of the two human cell lines TF-1 and A172. Control IL-15 cross-linking to cell surface IL-15R α expressed by TF-1 cells showed a band at 68 kDa, corresponding to the cross-linking of one molecule of IL-15 with a receptor of 55 kDa. Thus, the shedding of IL-15R α on this cell line resulted in the removal of 13 kDa (from 55 to 42 kDa).

To further locate the site of cleavage, IL-15R α cDNA lacking exons encoding different parts of the extracellular domain were transfected in COS-7 cells and the supernatants analyzed in the IL-15R α -specific RIA (Fig. 4). No signal was obtained with COS-7 cells transfected with IL-15R α Δ 2 (COS-IL-15R α Δ 2). This result was expected because one of the mAb in the RIA (M161) reacts with an epitope belonging to the domain (so called sushi domain) encoded by exon 2 (J. Bernard, unpublished observations). RIA-positive sIL-15R α material was observed in supernatants of COS-7 cells transfected with IL-15R α lacking either the exon 3, exon 4, or exon 5 encoded domain. In each case, the release of sIL-15R α was increased by PMA (Fig. 4). By IL-15 cross-linking, it was observed in each case that the sIL-15R α had a molecular mass lower than the one released from COS-7 cells

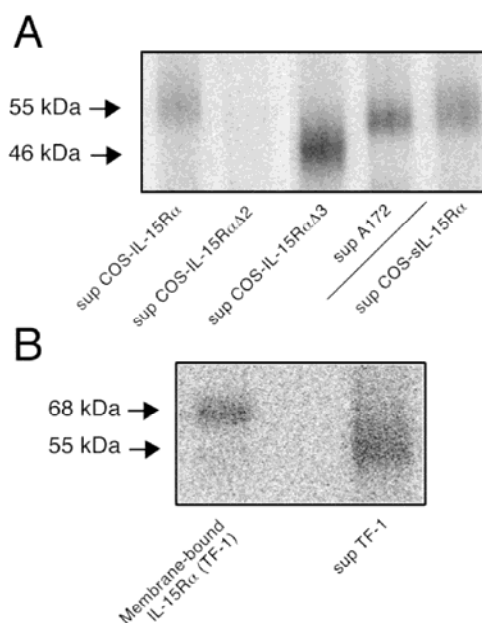


FIGURE 3. Cross-linking of iodinated human rIL-15 to sIL-15R α and membrane-bound IL-15R α . *A*, Soluble IL-15R α purified from supernatants (sup) of different cell lines as indicated were incubated with iodinated human rIL-15 (2 nM), cross-linked with EGS and subjected to SDS-PAGE and autoradiography. *B*, For membrane-bound IL-15R α , TF-1 cells were incubated with iodinated rIL-15 (2 nM), cross-linked with EGS, lysed and subjected to SDS-PAGE and autoradiography.

transfected with wild-type IL-15R α , in agreement with the deletion of part of the extracellular domain. This is illustrated in Fig. 3 for the soluble receptor immunopurified from the supernatants of IL-15R α Δ 3 transfected COS-7 cells (COS-IL-15R α Δ 3); a cross-linked band is observed with a mass (46 kDa) ~7 kDa lower than the one derived from COS-7 cells transfected with wild-type IL-15R α .

Effect of protease inhibitors on sIL-15R α release

Several protease inhibitors were used to define the molecular mechanisms and enzyme(s) responsible for the cleavage of membrane IL-15R. Common cysteine-, serine- and acidic-proteases inhibitors, aprotinin (0.1 μ M), leupeptin (1 μ M), EDTA (1 mM), and PMSF (1 mM), were unable to inhibit the IL-15R α shedding by COS-IL-15R α cells stimulated or not with PMA (data not shown). The proline endopeptidase inhibitor, S17092-1 (1 μ M) (15), was also inactive. By contrast (Fig. 5), the GM6001 (4 μ g/ml) (28), a potent broad-spectrum hydroxamic acid inhibitor of MMPs, completely prevented the stimulatory effect of PMA on membrane-bound IL-15R α shedding. GM6001-neg, a control synthetic compound that is not inhibitory of MMPs, was without effect. However, the basal IL-15R α shedding observed in the absence of PMA was not significantly affected by GM6001 (Fig. 5), even when used at 3-fold higher concentrations (12 μ g/ml) (data not shown).

Soluble IL-15R α released by shedding binds IL-15 and inhibits IL-15 binding to cell surface IL-15R α with high affinity

The affinity for IL-15 of the soluble IL-15R α prepared from full-length IL-15R α transfected COS-7 cells was evaluated in a sandwich assay using AF247 to capture the receptor and increasing

Table I. Cell surface expression of IL-15R α , IL-2R β , and IL-2R γ and release of sIL-15R α by different cell lines

Cell Lines	Specific (+) or No Specific (–) Expression			Culture Supernatants (ng)
	IL-15R α (MFI ratios) ^a	IL-2R β	IL-2R γ	
U937	– (1.12 $\pm$ 0.24)	+ ^b	+ ^b	nd
A172	+ (2.19 $\pm$ 0.21)	– ^c	– ^c	1.5
TF-1	+ (4.33 $\pm$ 0.05)	– ^d	+ ^d	1.68
TF-1 β	+ (2.84 $\pm$ 0.23)	+ ^e	+ ^e	1
Kit 225	+ (5.46 $\pm$ 0.99)	+ ^e	+ ^e	1.7

^a Cells were analyzed by flow cytometry after incubation with M161 mAb per isotype control as part of this study (data not shown). Value shown is the mean fluorescence intensity (MFI) ratio $\pm$ SE.

^b Flow cytometry analysis as previously described (25).

^c Northern blot analysis as previously described (26).

^d Analyzed by RT-PCR as previously described (27).

^e Flow cytometry analysis from this study (data not shown).

nd, Not detectable.

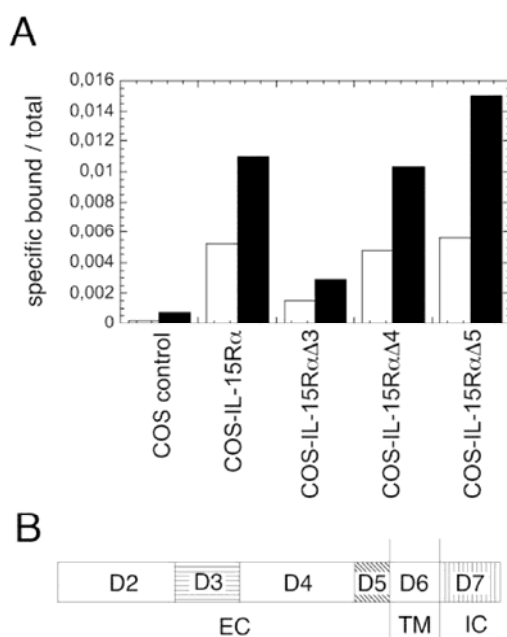


FIGURE 4. Effect of IL-15R α domain deletion on IL-15R α shedding. **A**, COS-7 cells were transfected with plasmid coding for IL-15R α or IL-15R α lacking the exon 3, exon 4, or exon 5 encoded domain. Cells were cultured in presence (■) or absence (□) of PMA (100 ng/ml). Released sIL-15R α was analyzed by RIA. **B**, Schematic representation of the full-length IL-15R α showing the exon-encoded domains is presented. EC, TM, and IC denote extracellular, transmembrane, and intracellular parts of IL-15R α , respectively.

concentrations of iodinated human rIL-15 as tracer. A saturation-binding curve was obtained (Fig. 6A), which after Scatchard transformation, allowed the estimate of the affinity of IL-15 for the soluble receptor. An equilibrium dissociation constant (K_D = 166 pM) was measured, a value that is comparable to the one describing high affinity binding of IL-15 to cell surface IL-15R α on TF-1 cells (K_D = 79 pM, data not shown).

We next analyzed whether the soluble receptor could compete with IL-15 binding to cell surface receptors. TF-1 cells express cell surface IL-15R α and IL-2R γ -chain but not IL-2R β -chain, and IL-15 binding reflects binding to the isolated IL-15R α . As shown in Fig. 6B, soluble IL-15R α material immunopurified from different cell supernatants were able to efficiently inhibit IL-15 binding to TF-1 cells. Based on the concentrations of sIL-15R α present in these immunopurified fractions (as determined by the RIA), the IC_{50} reflecting half-maximal inhibitory effects were calculated. Soluble IL-15R α from COS-IL-15R α and A172 displayed very similar, high affinity, IC_{50} (20 and 22 pM, respectively). A sIL-15R α purified from the supernatants of COS-7 cells transfected with a cDNA encoding the extracellular domain of human IL-15R α (COS-sIL-15R α) also fully inhibited IL-15 binding to TF-1 cells with a similar efficiency (IC_{50} = 35 pM).

Soluble IL-15R α released by shedding is a specific and high affinity inhibitor of IL-15-induced cell proliferation

The Kit 225 human cell line expresses the IL-2R β -chain and IL-2R γ -chain as well as the IL-2R α -chain and IL-15R α , and proliferates in response to IL-2 or IL-15. The sIL-15R α purified from the supernatants of different cell lines (COS-IL-15R α , COS-

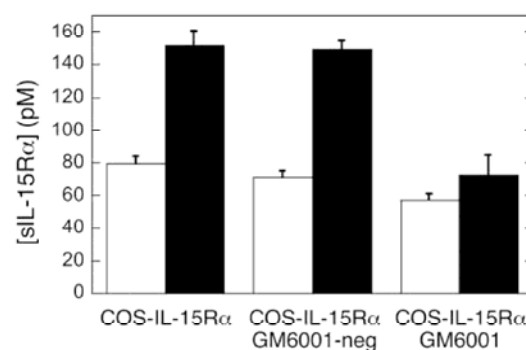


FIGURE 5. Effect of the GM6001, a MMPs inhibitor, on the release of sIL-15R α . COS-IL-15R α cells were cultured in the presence or absence of 4 μ g/ml GM6001 or control GM6001-neg, and stimulated (■) or not (□) with 100 ng/ml PMA. Released sIL-15R α was analyzed by RIA. Data are the means $\pm$ SD of triplicate cultures and are representative of three experiments.

sIL-15R α , A172) were all found to inhibit the IL-15-dependent proliferation of Kit 225 cells (Fig. 7A), while being without effect on the IL-2-dependent proliferation (Fig. 7B). The inhibitory effects were complete with high affinity IC_{50} in the range from 3 to 10 pM.

The murine 32D β R cells express endogenous mouse IL-2R γ -chain and transfected human IL-2R β -chain and IL-15R α . The different sIL-15R α also inhibited IL-15-induced proliferation of 32D β R (Fig. 7C) with inhibitory effects comparable to those found with Kit 225 cells. As shown in Fig. 7D, 32D β R proliferate dose dependently in response to human IL-15 (EC_{50} = 6 pM). In the presence of a constant low concentration (15 pM) of soluble IL-15R α purified from COS-IL-15R α , this dose-response curve was found to be markedly shifted toward higher IL-15 concentrations (EC_{50} = 80 pM). Material similarly purified from COS-7 cells transfected with empty vector did not affect the dose-response curve.

Discussion

In this study, we have shown the existence of a soluble form of the human IL-15R α that is naturally produced in the supernatants of cells expressing the membrane-anchored cognate receptor chain. This sIL-15R α is constitutively released and this process can be increased by several stimuli. It binds IL-15 with high affinity and is able at low, picomolar concentrations to specifically block IL-15 interaction with its cell surface receptor and inhibit cell proliferation induced by IL-15.

The identification of sIL-15R α was made feasible by the development of a highly sensitive RIA (detection limit of $\sim$ 1 pM). One of the Abs used in this RIA, M161, reacts with an IL-15R α epitope involved in the binding of IL-15 and blocks this binding (J. Bernard, unpublished observations). We therefore anticipate that this RIA only detects sIL-15R α that is not bound to endogenous IL-15 that might be produced by the cell lines investigated.

Two physiological mechanisms have been described for the generation of soluble receptors. The first one is based on the de novo synthesis of the soluble receptor from alternatively spliced mRNA, the second involves liberation of the soluble receptor following proteolytic cleavage of the membrane-anchored receptor counterpart (1). Two observations initially suggested that the sIL-15R α was likely generated by proteolytic cleavage and release. First, whereas a number of alternatively spliced transcripts coding

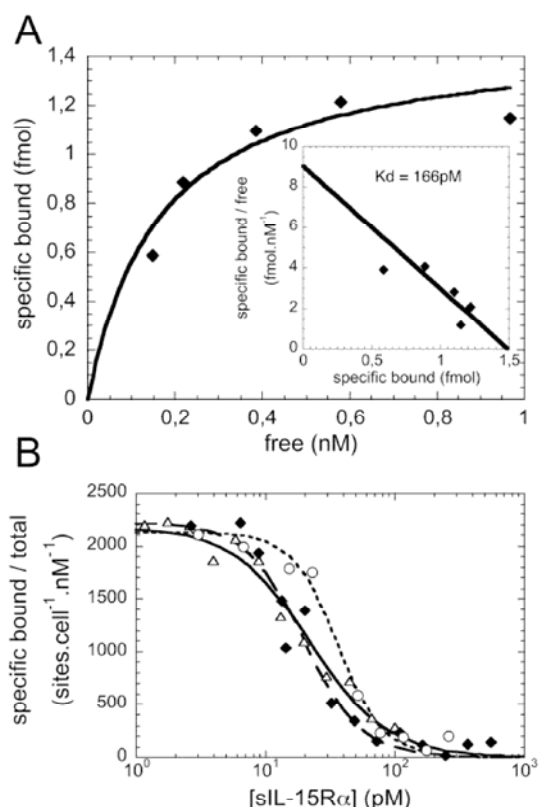


FIGURE 6. Binding of IL-15 to IL-15R α and inhibitory effects of sIL-15R α on IL-15 binding to membrane bound IL-15R α . **A**, sIL-15R α purified from COS-IL-15R α supernatants was incubated at a fixed concentration with anti-IL-15R α mAb (AF247) coated on multiwell plates, in the presence of an increasing amount of radio-iodinated human rIL-15 (100 pM). Bound and unbound IL-15 fractions were determined and the specific binding calculated after subtraction of the nonspecific component. Data are representative of two independent experiments. **B**, TF-1 cells were equilibrated with a fixed concentration of radio-iodinated human rIL-15 (100 pM) and increasing concentration of sIL-15R α purified from: COS-IL-15R α ($\blacklozenge$), COS-sIL-15R α ($\circ$), or A172 ($\triangle$). The specific binding was measured after subtraction from the total binding of the nonspecific binding (determined in the presence of a 100-fold excess of unlabeled IL-15). Data are representative of three independent experiments.

for different isoforms of membrane-anchored IL-15R α have been identified (20, 26, 29), no transcript coding for sIL-15R α has been described so far. Second, stimulation of soluble receptor production in culture supernatants was accompanied by a decrease in IL-15R α expressed at the cell surface. Finally, direct proof of the involvement of receptor shedding was provided by transfection experiments in COS-7 cells that do not express endogenous human IL-15R α . After transfection with a cDNA coding for the full-length IL-15R α , these cells released in their supernatants a sIL-15R α whose molecular mass (42 kDa) was 13 kDa lower than that of membrane bound IL-15R α (55 kDa), and was indistinguishable from that of a recombinant form of the extracellular domain of IL-15R α expressed in the same COS-7 cells. Thus, at least in these transfectants, alternative splicing could be excluded as being involved in sIL-15R α generation. Soluble IL-15R α species produced by the different cell lines examined had molecular masses also indistinguishable from that of recombinant soluble IL-15R α , indi-

cating the occurrence in these cells a shedding process similar as in COS-7 cells.

A number of protease inhibitors were tested to define the enzyme(s) responsible for the cleavage of the membrane bound IL-15R α . In contrast to the protease inhibitors aprotinin, EDTA, leupeptin, PMSF, and S17092-1, the synthetic zinc-metalloproteinases inhibitor GM6001 blocked PMA-induced sIL-15R α release in culture supernatants, while leaving basal unstimulated sIL-15R α release unaffected. At least two different proteolytic mechanisms appear to participate in the cleavage of IL-15R α , one of which specifically involving metalloproteinases, as already shown for other cytokine receptors (30), and in particular the structurally related IL-2R α -chain (13). The family of metalloproteinases includes a disintegrin and metalloproteinase, ADAM, whose first identified member is the TNF- α converting enzyme (ADAM17), and the MMPs. As GM6001 is broad spectrum MMP inhibitor (28), additional experiments using purified enzymes are required to define the MMPs involved.

For the majority of proteins released by shedding, the proteases responsible have not been identified yet. In addition, it appears that for one protein, different proteases can be involved, and conversely, one protease can cleave several proteins. The size of the sIL-15R α indicated that it was generated by cleavage at a site or sites proximal to the plasma membrane, as previously shown for other soluble cytokine receptors (1). This result suggests that at least one of the potential cleavage sites is located in a region of the extracellular domain of the receptor that is proximal to the trans-membrane domain. Deletion of the exon 4 and exon 5 encoded domains that are in proximity to the plasma membrane did not abrogate the shedding processes, either basal or stimulated with PMA. Two hypotheses can be raised that are not mutually exclusive. The first is that several cleavage sites can be used that are located at several positions in the extracellular domain of the receptor, the second is that a cleavage site is located at the N-terminal end of the exon 6 encoded transmembrane domain and accessible to metalloproteinases. Additional deletion and mutational experiments are under way to define more precisely the site(s) of cleavage.

All cell lines tested that express membrane IL-15R α (A172, TF-1, TF1- β , and Kit 225) released sIL-15R α in their supernatants, and it can be anticipated that such IL-15R α -positive cells may represent a potential source for this soluble receptor in vivo. The phorbol ester PMA, previously shown to enhance the proteolytic shedding of several cytokine receptors (24, 31), is similarly shown in this study to strongly enhance the shedding of sIL-15R α , indicating that protein kinase C-dependent pathways are involved in the induction of receptor release (32). Ca²⁺ mobilization with ionomycin also stimulated IL-15R α shedding, as previously shown for IL-6R (33). IL-1 β and TNF- α also increased sIL-15R α release, a process that might also be related to the reported induction of protein kinase C and MMP-9 by these cytokines (34).

In most cases, soluble receptor ectodomains generated by proteolysis appear to retain the ligand binding characteristics of their membrane-anchored counterparts. Therefore, in cases in which the receptor (IL-2R α , IL-5R α , IL-7R α , GM-CSFR α) is a low affinity receptor that associates with other receptor subunits to build the high affinity membrane receptor complex, its soluble counterpart has an affinity that is much lower than that of the high affinity membrane receptor. In other cases (IL-4R, IL-1RI and IL-1RII; TNFRI and TNFRII) in which the receptor contributes to most of the affinity of the multimeric membrane receptor, the soluble counterpart has a high affinity similar to that of the membrane receptor. Our results indicate that the second case applies for the sIL-15R α . It binds IL-15 with a high affinity similar to that measured for the

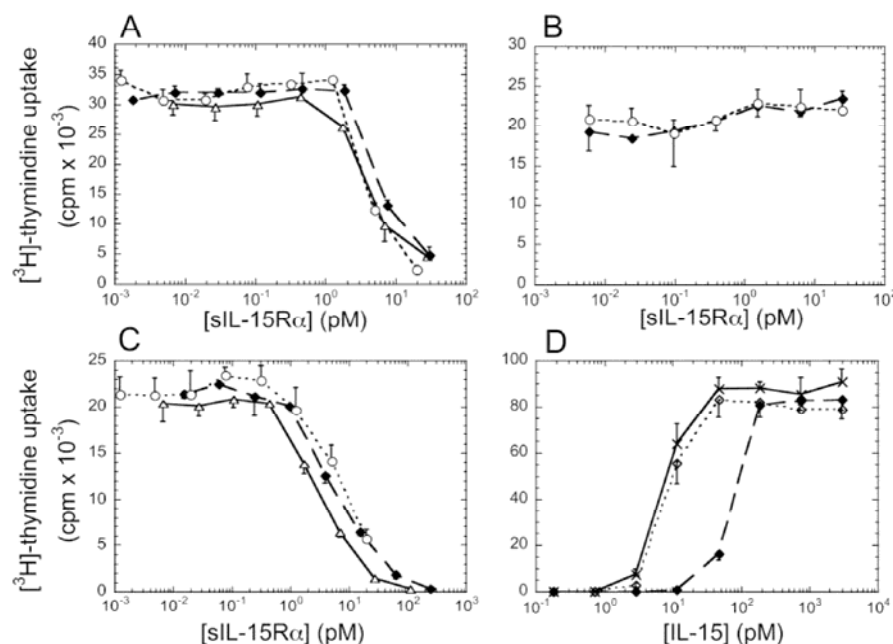


FIGURE 7. Effects of sIL-15R α on cytokine-induced cell proliferation. Cell proliferation was evaluated by the incorporation of [3 H]thymidine. Kit 225 cells were cultured with a fixed concentration of IL-15 (10 pM) (A) or IL-2 (10 pM) (B) and increasing concentrations of sIL-15R α purified from COS-IL-15R α ($\blacklozenge$), COS-sIL-15R α ($\circ$), or A172 ($\triangle$) supernatants. C, 32D β R cells were cultured with a fixed concentration of human rIL-15 (10 pM) and increasing concentrations of sIL-15R α purified from COS-IL-15R α ($\blacklozenge$), COS-sIL-15R α ($\circ$), or A172 ($\triangle$). D, 32D β R cells were cultured with increasing concentrations of human rIL-15, in the absence ($\times$) or presence of a fixed concentration (15 pM) of sIL-15R α purified from COS-IL-15R α ($\blacklozenge$) or, as negative control, of immunopurified material from COS-7 transfected with empty vector ($\diamond$). Data are the means $\pm$ SD of triplicate cultures and are representative of two independent experiments.

cell-associated IL-15R α expressed alone or in complex with the IL-2R β and IL-2R γ subunit. Accordingly, the sIL-15R α acted as a potent competitor of IL-15 binding to the membrane receptors, being able at low concentrations (IC_{50} = 20 pM) to completely abrogate this binding. The sIL-15R α behaved also as a potent and specific antagonist of the biological activity of IL-15. It completely inhibited IL-15-induced cell proliferation at concentrations (IC_{50} = 3 to 10 pM) similar to those required to block IL-15 binding, without affecting IL-2 driven cell proliferation. Similar results have been reported for a soluble form of the IL-4R. In that case however, the amounts of sIL-4R needed to block the biological activity of IL-4 were substantially ($\sim$ 10-fold) higher than those required for inhibition of IL-4 binding (35). This difference was due to a faster off-rate for the soluble form, a result consistent with a potential role as carrier protein for IL-4 (36). The fact that the sIL-15R α is as or even more efficient in inhibiting biological activity than in binding argues against such a role. Whether it could act, like the sIL-4R (36) as a protective ligand against IL-15 degradation remains to be evaluated.

The existence of soluble receptors suggests that they have an important role in normal physiology, in the response to diseases and in the development of pathological processes (37). The IL-15 system is tightly regulated under physiological conditions and a number of disorders have been reported that are associated with activation or defects of the IL-15 system. Among these disorders are autoimmune diseases, inflammatory diseases, infectious diseases, transplant rejection, cancer, and immunodeficiencies (38). Inasmuch as IL-15R α transcripts are expressed by many cell types and tissues, and as sIL-15R α displays high affinity and IL-15 blocking efficiency in vitro, this soluble receptor can be anticipated

to exert an important role in physiology and pathology. IL-15 has been detected in the biological fluids of patients with chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (39), inflammatory bowel diseases (40), pulmonary diseases (41), and chronic active hepatitis (42). The availability of specific RIAs able to measure the levels of sIL-15R α (this study) and IL-15-sIL-15R α complex (E. Mortier, unpublished observations) will enable a better analysis of the regulation of the IL-15 system in such diseases.

Based on their cytokine neutralizing properties, some soluble receptors have been introduced in clinical trials, one well known example being the soluble TNFR used for the treatment of rheumatoid arthritis (43). Due to its efficient antagonist activity, sIL-15R α is an attractive candidate for therapeutic applications. Indeed, preclinical studies in the mouse (44, 45) have already highlighted the potential interest of sIL-15R α .

References

1. Fernandez-Botran, R., P. M. Chilton, and Y. Ma. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv. Immunol.* 63:269.
2. Jones, S. A., and S. Rose-John. 2002. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592:251.
3. Mullberg, J., F. H. Durie, C. Otten-Evans, M. R. Alderson, S. Rose-John, D. Cosman, R. A. Black, and K. M. Mohler. 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J. Immunol.* 155:5198.
4. Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. I'ung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh, et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin 2 receptor. *Science* 264:965.
5. Giri, J. G., D. M. Anderson, S. Kumaki, L. S. Park, K. H. Grabstein, and D. Cosman. 1995. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J. Leukocyte Biol.* 57:763.

6. Giri, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. DuBose, D. Cosman, L. S. Park, and D. M. Anderson. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 14:3654.
7. Norman, D. G., P. N. Barlow, M. Baron, A. J. Day, R. B. Sim, and I. D. Campbell. 1991. Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J. Mol. Biol.* 219:717.
8. Miyazaki, T., Z. J. Liu, A. Kawahara, Y. Minami, K. Yamada, Y. Tsujimoto, E. L. Barsoumian, R. M. Permuter, and T. Taniguchi. 1995. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81:223.
9. Johnston, J. A., C. M. Bacon, D. S. Finbloom, R. C. Rees, D. Kaplan, K. Shibuya, J. R. Ortaldo, S. Gupta, Y. Q. Chen, J. D. Giri, et al. 1995. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8705.
10. Nelson, B. H., and D. M. Willerford. 1998. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.* 70:1.
11. Jacques, Y., B. Le Mauff, F. Boeffard, A. Godard, and J. P. Soullou. 1987. A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity. *J. Immunol.* 139:2308.
12. Schulz, O., H. F. Sewell, and F. Shakib. 1998. Proteolytic cleavage of CD25, the α subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.* 187:271.
13. Sheu, B. C., S. M. Hsu, H. N. Ho, H. C. Lien, S. C. Huang, and R. H. Lin. 2001. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 61:237.
14. Dummer, R., G. Posseckert, K. Sugamura, H. Grundmann, and G. Burg. 1996. Circulating interleukin-2 receptors are a group of multimeric proteins with immunoreactivity for interleukin-2 receptor α , β , and γ chains. *J. Interferon Cytokine Res.* 16:315.
15. Barelli, H., A. Petit, E. Hirsch, S. Wilk, G. De Nanteuil, P. Morain, and F. Checler. 1999. S17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:657.
16. Hori, T., T. Uchiyama, M. Tsudo, H. Umadome, H. Ohno, S. Fukuhara, K. Kita, and H. Uchino. 1987. Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood* 70:1069.
17. Kitamura, T., T. Tange, T. Terasawa, S. Chiba, T. Kuwaki, K. Miyagawa, Y. F. Piao, K. Miyazono, A. Urabe, and F. Takaku. 1989. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell. Physiol.* 140:323.
18. Farner, N. L., J. Gan, J. L. de Jong, T. P. Leary, T. S. Fenske, P. Buckley, S. Dunlap, and P. M. Sondel. 1997. Alteration of the CD34⁺ TF-1 β cell line profile in response to long-term exposure to IL-15. *Cytokine* 9:316.
19. Nakamura, Y., S. M. Russell, S. A. Mess, M. Friedmann, M. Eidos, C. Franco, Y. Jacques, S. Adelstein, and W. J. Leonard. 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor β - and γ -chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* 369:330.
20. Dubois, S., F. Magrangeas, P. L  hours, S. Raher, J. Bernard, O. Boisteau, S. Leroy, S. Minvielle, A. Godard, and Y. Jacques. 1999. Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor α -chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem.* 274:26978.
21. Bernard, J., C. Harb, E. Mortier, A. Quenecener, R. H. Melen, C. Vermot-Desroches, P. Wijdeness, P. Van Dijken, J. Grotzinger, J. W. Slootstra, et al. 2004. Identification of an interleukin-15 α receptor binding site on human interleukin-15. *J. Biol. Chem.* 279:24313.
22. Fraker, P. J., and J. C. Speck, Jr. 1978. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:849.
23. Tejedor, F., and J. P. Ballesta. 1982. Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Anal. Biochem.* 127:143.
24. Mullberg, J., H. Schoolink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* 23:473.
25. Bosco, M. C., I. Espinoza-Delgado, T. K. Rowe, M. G. Malabarba, D. L. Longo, and L. Varesio. 1997. Functional role for the myeloid differentiation antigen CD14 in the activation of human monocytes by IL-2. *J. Immunol.* 159:2922.
26. Anderson, D. M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, et al. 1995. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270:29862.
27. Meazza, R., S. Basso, A. Gaggero, D. Detorero, I. Trentin, R. Pereno, B. Azzarone, and S. Ferrini. 1998. Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor β/γ . *Int. J. Cancer* 78:189.
28. Galardy, R. E., D. Grobelny, H. G. Foellmer, and L. A. Fernandez. 1994. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloproteinase inhibitor N-[2R-2-(hydroxymethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res.* 54:4715.
29. Bulanova, E., V. Budagian, Z. Orinska, H. Krause, R. Paus, and S. Bulfone-Paus. 2003. Mast cells express novel functional IL-15 receptor α isoforms. *J. Immunol.* 170:5045.
30. Hooper, N. M., E. H. Karran, and A. J. Turner. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321:263.
31. Arribas, J., L. Coodly, P. Vollmer, T. K. Kishimoto, S. Rose-John, and J. Massagu  . 1996. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloproteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271:11376.
32. Mullberg, J., H. Schoolink, T. Stoyan, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1992. Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:794.
33. Jones, S. A., S. Horiuchi, D. Novick, N. Yamamoto, and G. M. Fuller. 1998. Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca^{2+} mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells. *Eur. J. Immunol.* 28:3514.
34. Esteve, P. O., E. Chicoine, O. Robledo, F. Aoudjit, A. Descoteaux, E. F. Potworowski, and Y. St-Pierre. 2002. Protein kinase C- ζ regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF- α in glioma cells via NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 277:35150.
35. Fernandez-Botran, R., and E. S. Vitetta. 1990. A soluble, high-affinity, interleukin-4-binding protein is present in the biological fluids of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4202.
36. Fernandez-Botran, R., and E. S. Vitetta. 1991. Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. *J. Exp. Med.* 174:673.
37. Heaney, M. L., and D. W. Golde. 1998. Soluble receptors in human disease. *J. Leukocyte Biol.* 64:135.
38. Fehninger, T. A., and M. A. Caligiuri. 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97:14.
39. McInnes, I. B., J. al-Mughales, M. Field, B. P. Leung, F. P. Huang, R. Dixon, R. D. Sturrock, P. C. Wilkinson, and F. Y. Liew. 1996. The role of interleukin 15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2:175.
40. Liu, Z., K. Geboes, S. Colpaert, G. R. D. Haens, P. Rutgeerts, and J. L. Couppens. 2000. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J. Immunol.* 164:3608.
41. Agostini, C., L. Trentin, M. Faccio, R. Sances, A. Cerutti, C. Tassinari, L. Cimarosto, F. Adami, A. Cipriani, R. Zambello, and G. Semenzato. 1996. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157:910.
42. Kakumu, S., A. Okumura, T. Ishikawa, M. Yano, A. Enomoto, H. Nishimura, K. Yoshioka, and Y. Yoshika. 1997. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor- α (TNF- α) receptors in type C chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 109:458.
43. Moreland, L. W., S. W. Baumgartner, M. H. Schiff, E. A. Tindall, R. M. Fleischmann, A. L. Weaver, R. E. Fittinger, S. Cohen, W. J. Koopman, K. Mohler, et al. 1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.* 337:141.
44. Smith, X. G., E. M. Bolton, H. Ruchatz, X. Wei, F. Y. Liew, and J. A. Bradley. 2000. Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor α -chain enhances cardiac allograft survival. *J. Immunol.* 165:3444.
45. Ruchatz, H., B. P. Leung, X. Q. Wei, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 1998. Soluble IL-15 receptor α -chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J. Immunol.* 160:5654.

II. Effet agoniste du IL-15R α -sushi soluble en présence d'IL-15 sur les cellules exprimant IL-2R β et γ_c .

A. Résumé.

L'IL-15 est essentielle à la génération de différents types lymphocytaires (cellules NK, cellules NK-T et lymphocytes T CD8 mémoires). Le mécanisme de *transprésentation* de l'IL-15 par les cellules présentatrices d'antigènes est décrit comme dominant dans l'activation de ces lymphocytes. Nos travaux ultérieurs ont permis de mettre en évidence une forme soluble de la chaîne IL-15R α . Le sIL-15R α est constitué de la partie extracellulaire de l'IL-15R α membranaire et est un fort antagoniste de l'action de l'IL-15. Nous démontrons dans cette présente étude que le domaine majeur de fixation de l'IL-15, c'est-à-dire le domaine sushi, sous sa forme soluble recombinante (sIL-15R α -sushi), présente un effet agoniste de l'IL-15 sur les cellules exprimant les chaînes réceptrices IL-2R β et γ_c , en augmentant sa fixation et ses effets biologiques (prolifération et apoptose). Par contre, le sIL-15R α -sushi est sans effet sur la prolifération des cellules présentant le récepteur trimérique de haute affinité. Ce phénomène pourrait participer au mécanisme de *transprésentation* de l'IL-15 si une telle forme soluble du sushi existait naturellement. Afin d'optimiser cet effet agoniste, nous avons construit des protéines de fusion (RLI et ILR) constituées d'une molécule d'IL-15 liée, grâce à un linker flexible, à une molécule de sIL-15R α -sushi. Ces protéines de fusion s'avèrent être plus efficaces que le mélange équimolaire de l'IL-15 avec le sIL-15R α -sushi. La protéine de fusion RLI, après sa fixation sur les cellules par l'intermédiaire du complexe IL-2R β / γ_c , est internalisée et induit une réponse biologique similaire à la réponse passant par le récepteur de haute affinité. Une telle protéine de fusion pourrait constituer un adjuvant potentiel pour l'expansion de certaines populations lymphocytaires portant l'hétérodimère IL-2R β / γ_c .

B. Introduction.

L'IL-2 et l'IL-15 jouent des rôles clés dans l'immunité innée et adaptative. Les études préliminaires quant aux rôles des deux cytokines ont montré des actions communes (notamment l'induction de la prolifération et de la cytotoxicité des lymphocytes T activés et des cellules NK) (Burton *et al.* 1994; Carson *et al.* 1994; Grabstein *et al.* 1994; Wilkinson and Liew 1995). Des résultats plus récents révèlent que ces cytokines exercent des actions complémentaires voire opposées *in vivo* grâce à des expériences de "knock out" chez la souris. Alors que les KO de l'IL-2 et de la chaîne IL-2R α sont associés à une augmentation des populations cellulaires B et T activés, les KO de l'IL-15 et de la chaîne IL-15R α se traduisent par un défaut en cellules NK, NK-T, en lymphocytes intra-épithéliaux et lymphocytes T CD8 mémoires (Lodolce *et al.* 1998; Kennedy *et al.* 2000). Par ailleurs, l'IL-2 assure la tolérance en provoquant l'activation de la mort induite des cellules (AICD) (Marks-Konczalik *et al.* 2000), alors que l'IL-15 inhibe cet effet de l'IL-2 (Ku *et al.* 2000).

Un nouveau mécanisme de présentation de l'IL-15 a été mis en évidence, dans lequel les cellules présentatrices d'antigène (monocytes et cellules dendritiques), qui expriment à la fois l'IL-15 et la chaîne IL-15R α , présentent l'IL-15 fixée à sa chaîne α , en *trans*, aux cellules voisines (cellules NK ou T CD8) exprimant seulement les chaînes transductrices IL-2R β et γ_c (Dubois *et al.* 2002). Ce mécanisme, appelé *transprésentation*, semble être le mécanisme principal d'action de l'IL-15 *in vivo* (Burkett *et al.* 2003) et jouerait un rôle majeur dans l'immuno-surveillance des tumeurs (Kobayashi *et al.* 2005).

Les chaînes α des récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15 présentent à leur partie N-terminale un domaine structural nommé domaine sushi (un pour la chaîne α de l'IL-15 et deux pour l'IL-2). La majeure partie de la fixation de l'IL-15 sur son récepteur est assurée par ce domaine sushi. Alors que l'affinité de l'IL-2 pour sa chaîne IL-2R α est faible ($K_d = 10$ nM), l'IL-15 lie l'IL-15R α avec une forte affinité ($K_d = 50$ pM). Une forme soluble de l'IL-2R α a été décrite et joue le rôle d'antagoniste *in vitro* à forte concentration. Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence l'existence d'une forme soluble de l'IL-15R α , fortement antagoniste de l'action de l'IL-15 (Mortier *et al.* 2004).

Dans cette étude, nous démontrons que le domaine sushi soluble (sIL-15R α -) a un effet opposé à la forme sIL-15R α . En effet, le sushi soluble est

capable d'augmenter la capacité de l'IL-15 à fixer le récepteur dimérique IL-2R β / γ_c , sans affecter la fixation de l'activité de l'IL-15 par son récepteur trimérique de haute affinité. Nous avons également étudié l'effet de protéines de fusion composées de l'IL-15 fixée par un linker à un domaine sushi de l'IL-15R α soluble qui agissent comme de forts agonistes du récepteur dimérique IL-2R β / γ_c .

C. Résultats.

Le domaine sushi du récepteur de l'IL-15 est indispensable à la fixation de la cytokine sur son récepteur. En effet, la délétion de l'exon 2 de l'IL-15R α codant pour le domaine sushi est incapable de lier l'IL-15. Nous avons construit différentes formes solubles recombinantes de l'IL-15R α afin de déterminer la contribution de ce domaine dans la fixation de l'IL-15. Les formes solubles de sushi (sIL-15R α -sushi et sIL-15R α -sushi-IL-2) fixent l'IL-15 avec une affinité de 7 nM et 423 pM respectivement. La différence d'affinité entre ces deux molécules pourrait s'expliquer par leur mode de production. En effet, le sIL-15R α -sushi est produit dans *E. Coli*, alors que le sIL-15R α -sushi-IL-2 est produit, comme la forme soluble totale du IL-15R α (sIL-15R α -IL-2) dans les cellules CHO. Ces affinités sont plus faibles que celle du sIL-15R α -IL-2 qui est de 38 pM. Les études d'inhibition de fixation de l'IL-15 sur le récepteur IL-15R α membranaire confirment ces résultats. Ces résultats indiquent que le domaine sushi est fortement impliqué dans la fixation de l'IL-15 sur son récepteur mais ne reconstitue pas, à lui seul, la haute affinité de l'IL-15R α .

Nous avons testé ensuite l'effet du sIL-15R α -sushi sur des cellules MO-7 et 32D β exprimant les chaînes réceptrices IL-2R β et γ_c mais pas la chaîne IL-15R α . Les cellules MO-7 répondent à des concentrations d'IL-15 et d'IL-2 de l'ordre du nanomolaire. Le sIL-15R α -sushi seul est sans effet, mais l'addition de 10 nM de sIL-15R α -sushi permet aux MO-7 de répondre à des doses 4 fois moins importante d'IL-15, alors que la prolifération en IL-2 des cellules n'est pas affectée. Des protéines de fusion, ILR et RLI, formées d'une molécule d'IL-15 et une molécule de sIL-15R α -sushi liées par un linker flexible, ont été construites. Ces protéines de fusion induisent une prolifération des cellules MO-7 avec un

EC_{50} de 30 pM, semblable à la prolifération en IL-15 des cellules exprimant le récepteur de haute affinité. Ces résultats confirment l'effet agoniste du sIL-15R α -sushi qui est renforcé en stabilisant l'interaction entre l'IL-15 et le sIL-15R α -sushi par un linker.

Ces résultats sont confirmés par des études d'apoptose par marquage à l'Annexine V. Après 48 h de culture sans cytokine, 80% des cellules MO-7 sont marquées à l'Annexine V. Le sIL-15R α -sushi seul est sans effet, alors que l'IL-15 (5 nM) réduit d'environ 10% l'apoptose. L'addition de sIL-15R α -sushi renforce l'effet protecteur de l'IL-15 (seulement 30% de cellules marquées à 48 h). Les effets de l'IL-15, en présence ou non du sIL-15R α -sushi, et de la protéine de fusion RLI, sont dose-dépendants. L'IL-15 agit sur l'apoptose des cellules avec un EC_{50} de 2 nM. En ajoutant 10 nM de sIL-15R α -sushi, cet EC_{50} est diminué de 10 fois (200 pM), tandis que le RLI, présente un EC_{50} encore plus faible (40pM).

Nous avons également observé que le sIL-15R α -sushi est capable d'augmenter l'affinité de l'IL-15 sur le récepteur IL-2R β / γ_c des MO-7. L'addition de 10 nM de sIL-15R α -sushi renforce l'affinité de l'IL-15 dont le K_D passe de 13 nM à 7 nM sans affecter le nombre de sites de liaison maximal présent à la surface des MO-7. La protéine de fusion RLI se fixe avec un nombre de sites équivalent mais une affinité nettement plus forte (d'environ 700 pM), et est ensuite internalisé.

Suite aux résultats obtenus sur les cellules exprimant les chaînes IL-2R β et γ_c , nous avons testé le sIL-15R α -sushi et les protéines de fusion sur des cellules Kit 225 et TF-1 β présentant le récepteur de haute affinité IL-15R α /IL-2R β / γ_c . Ces cellules répondent à de faibles doses d'IL-15 (30 pM), et l'addition de sIL-15R α -sushi (10 nM) est sans effet. Les cellules prolifèrent en réponse à des doses de protéines de fusion RLI et ILR équivalentes à celle de l'IL-15 (environ 30 pM) hormis le RLI qui, de manière surprenante, est 10 fois plus efficace sur les TF-1 β . Ces effets sont retrouvés par des études d'apoptose par marquage des cellules à l'Annexine V.

Le sIL-15R α -sushi n'ayant pas d'effets biologiques sur ces cellules, nous avons étudié son effet sur la fixation de l'IL-15. L'IL-15 se fixe sur les TF-1 β avec deux types d'affinité : une forte affinité (K_d = 20 pM) caractéristique des récepteurs trimériques IL-15R α /IL-2R β / γ_c , et une affinité plus faible (K_d = 30 nM) correspondant aux récepteurs IL-2R β / γ_c . Le sIL-15R α -sushi augmente l'affinité de l'IL-15 pour le récepteur intermédiaire

IL-2R β / γ_c ($K_d = 3,5$ nM). À de faibles concentrations d'IL-15, le sIL-15R α -sushi est incapable d'inhiber la fixation d'IL-15 sur les TF-1 β , ce qui montre qu'il est sans effet sur le récepteur de haute affinité IL-15R α /IL-2R β / γ_c . Nous avons également montré que le sIL-15R α -sushi n'est capable de se fixer sur les cellules TF-1 β que par l'intermédiaire de l'IL-15 et que l'IL-15 est indispensable à son internalisation. La protéine de fusion RLI se fixe sur les cellules avec une forte affinité ($K_d = 250$ pM) avec un nombre de sites comparable au nombre de sites de fixation d'affinité intermédiaire.

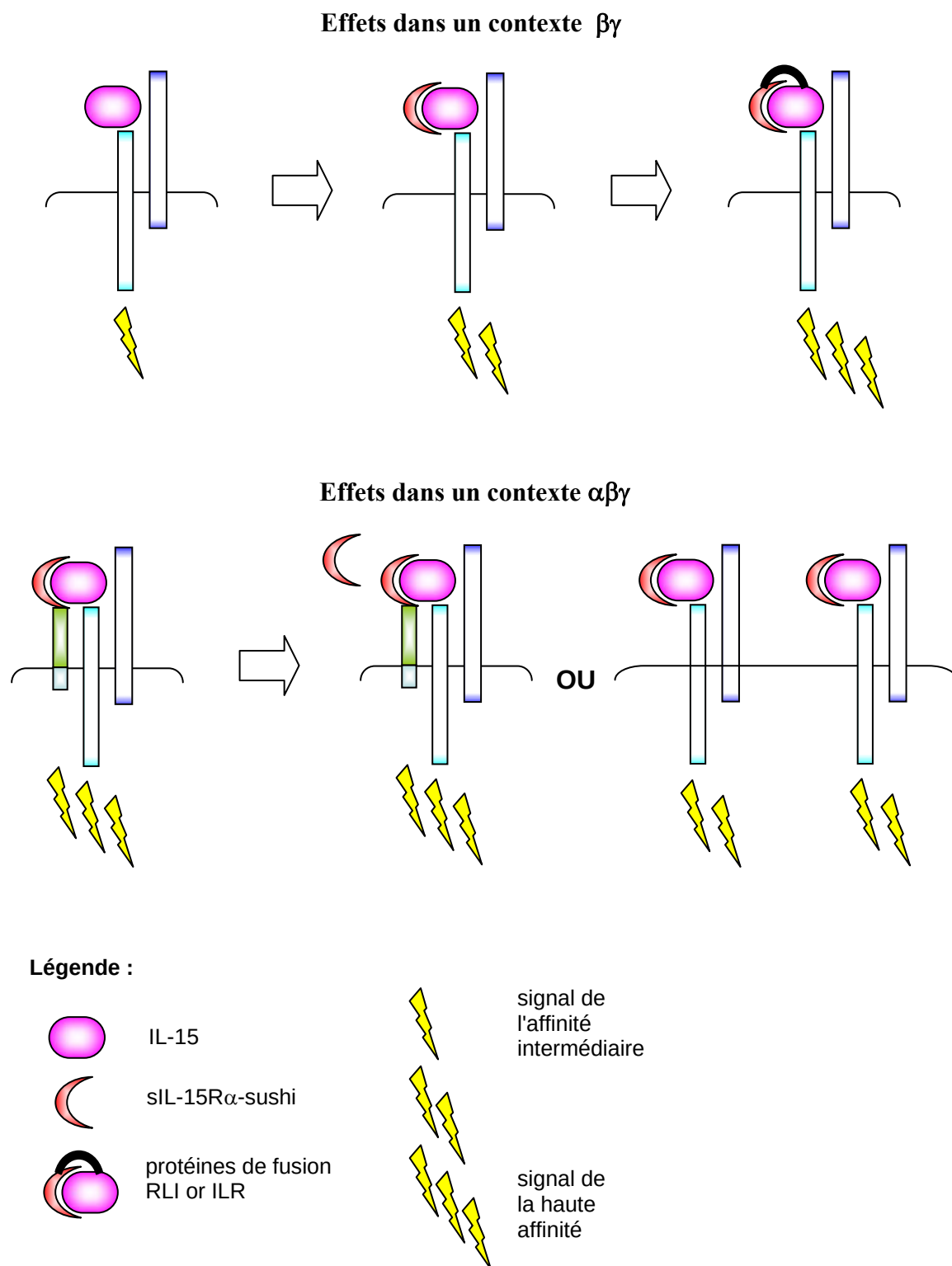


Figure 14 : Schéma Récapitulatif de l'Effet Agoniste du sIL-15R α -sushi et des Protéines de Fusion IL-15 / sIL-15R α -sushi.

D. Article II.

Soluble IL-15R α Sushi as a Selective and Potent Agonist of IL-15 Action Through IL-15R β/γ : Hyper- Agonist IL-15-IL-15R α Fusion Proteins.

(Mortier E., *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281)

Soluble Interleukin-15 Receptor α (IL-15R α)-sushi as a Selective and Potent Agonist of IL-15 Action through IL-15R β/γ

HYPERAGONIST IL-15·IL-15R α FUSION PROTEINS*

Received for publication, August 5, 2005, and in revised form, October 26, 2005. Published, JBC Papers in Press, November 11, 2005, DOI 10.1074/jbc.M508624200

Erwan Mortier^{‡§1}, Agnès Quemener^{‡§}, Patricia Vusio[§], Iken Lorenzen[¶], Yvan Boublik^{||}, Joachim Grötzinger[¶], Ariane Plet^{‡§}, and Yannick Jacques^{‡§2}

From [‡]INSERM, U601, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs, Institut de Biologie, Nantes F-44093, France, the [§]Université de Nantes, UFR Médecine, IFR26, Institut de Biologie, Nantes F-44093, France, the [¶]Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel D-24098, Germany, and the ^{||}CNRS, FRE 2593, Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier, F-34293 France

Interleukin-15 (IL-15) is crucial for the generation of multiple lymphocyte subsets (natural killer (NK), NK-T cells, and memory CD8 T cells), and transpresentation of IL-15 by monocytes and dendritic cells has been suggested to be the dominant activating process of these lymphocytes. We have previously shown that a natural soluble form of IL-15R α chain corresponding to the entire extracellular domain of IL-15R α behaves as a high affinity IL-15 antagonist. In sharp contrast with this finding, we demonstrate in this report that a recombinant, soluble sushi domain of IL-15R α , which bears most of the binding affinity for IL-15, behaves as a potent IL-15 agonist by enhancing its binding and biological effects (proliferation and protection from apoptosis) through the IL-15R β/γ heterodimer, whereas it does not affect IL-15 binding and function of the tripartite IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ membrane receptor. Our results suggest that, if naturally produced, such soluble sushi domains might be involved in the IL-15 transpresentation mechanism. Fusion proteins (RLI and ILR), in which IL-15 and IL-15R α -sushi are attached by a flexible linker, are even more potent than the combination of IL-15 plus sIL-15R α -sushi. After binding to IL-15R β/γ , RLI is internalized and induces a biological response very similar to the IL-15 high affinity response. Such hyper-IL-15 fusion proteins appear to constitute potent adjuvants for the expansion of lymphocyte subsets.

IL-15 receptors, such as those expressed on activated T cells, can be activated with picomolar concentrations of either cytokine, and additionally contain their own private α chain (IL-2R α and IL-15R α) that confers cytokine specificity and enhances the affinity of cytokine binding (3).

Both cytokines play pivotal roles in innate and adaptive immunity. Whereas initial *in vitro* experiments have shown a large functional overlap in the effects of the two cytokines (induction of the proliferation and cytotoxicity of activated lymphocytes and NK cells, co-stimulation of B cell proliferation and immunoglobulin synthesis, and chemoattraction of T cells) (1, 4–6), more recent experiments have indicated that they can exert complementary or even contrasting actions *in vivo*. Whereas IL-2 or IL-2R α knock-out in mice was associated with autoimmune phenotypes with increased populations of activated T and B cells, IL-15 and IL-15R α knock-out resulted in specific defects in NK, NK-T, intraepithelial lymphocytes, and memory CD8 T cells (7, 8). Furthermore, IL-2 promotes peripheral tolerance by inducing activation-induced cell death, whereas IL-15 inhibits IL-2-mediated activation-induced cell death (9), and, unlike IL-2, IL-15 is a survival factor for CD8 memory T cells (10). In line with these observations, it has been suggested that the major role of IL-2 is to limit continuous expansion of activated T cells, whereas IL-15 is critical for initiation of T cell division and survival of memory T cells (11). A novel mechanism of IL-15 action described recently is that of transpresentation in which IL-15 and IL-15R α are coordinately expressed by antigen-presenting cells (monocytes and dendritic cells), and IL-15 bound to IL-15R α is presented *in trans* to neighboring NK or CD8 T cells expressing only the IL-15R β/γ receptor (12). As a co-stimulatory event occurring at the immunological synapse, IL-15 transpresentation now appears to be a dominant mechanism for IL-15 action *in vivo* (13, 14) and appears to play a major role in tumor immunosurveillance (15).

The IL-15R α and IL-2R α subunits form a sub-family of cytokine receptors in that they comprise extracellular parts, so called “sushi” structural domains (one in IL-15R α and two in IL-2R α), at their N terminus, which are also found in complement or adhesion molecules (16). In both cases, these sushi domains have been shown to bear most of the structural elements responsible for cytokine binding. Whereas IL-2R α alone is a low affinity receptor for IL-2 ($K_d = 10$ nM), IL-15R α binds IL-15 with high affinity ($K_d = 100$ pM). Shedding of IL-2R α by proteolysis is a natural mechanism that participates in the down-regulation of lymphocyte activation. IL-2R α is cleaved by Der p1, a major mite allergen, thereby inhibiting Th1 cells and favoring an allergic environment (17). IL-2R α cleavage by tumor-derived metalloproteinases also results in the suppression of the proliferation of cancer-encoun-

IL-15³ is a cytokine that was originally described, like IL-2, as a T cell growth factor (1). Both cytokines belong to the four α -helix bundle family, and their membrane receptors share two subunits (the IL-2R/IL-15R β and γ chains) responsible for signal transduction (2). The IL-2R β/γ complex is an intermediate affinity receptor for both cytokines that is expressed by most NK cells and can be activated *in vitro* by nanomolar concentrations of IL-2 or IL-15. The high affinity IL-2 and

* This work was supported in part by INSERM, the CNRS, and the Association de la Recherche Contre le Cancer (Grant A03/1/3311). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies and by fellowships from the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Ligue Nationale Contre le Cancer.

² To whom correspondence should be addressed: INSERM U601, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France. Tel.: 33-2-40-08-47-23; Fax: 33-2-40-35-66-97; E-mail: yjacques@nantes.inserm.fr.

³ The abbreviations used are: IL-15, interleukin-15; IL-15R α , IL-15R α -chain; sIL-15R α -sushi, soluble IL-15R α sushi domain; ILR RLI, IL-15-sIL-15R α -sushi fusion protein; SPR, surface plasmon resonance; rIL, recombinant human IL-15; mIL, mouse interleukin; NK, natural killer cells.

Agonist Effect of Soluble IL-15R  -sushi

tered T cells (18). The soluble IL-2R   thus generated is a competitive inhibitor of IL-2 action *in vitro*. However, it remains a low affinity IL-2 binder and is not likely to efficiently participate in down-regulation of IL-2 activity *in vivo*.

We have recently shown that a soluble form of the human IL-15R   can also be naturally released from IL-15R  -positive cells by a shedding process involving MMPs (19). In contrast to soluble IL-2R  , this soluble IL-15R   receptor was able to bind IL-15 with high affinity and efficiently blocked proliferation driven through the high affinity IL-15R  /  /   signaling complex. This result was consistent with the concept of sIL-15R   behaving, like its homolog sIL-2R  , as an antagonist, and with the inhibitory effects of mouse sIL-15R   *in vitro* or *in vivo* (20, 21). Here, we show that a soluble receptor consisting of the N-terminal structural domain of IL-15R   (sushi domain) has the opposite action; it is able to enhance the binding as well as the bioactivity of IL-15 through the IL-15R  /   intermediate affinity receptor, without affecting binding and bioactivity through the high affinity receptor. In addition, we describe fusion proteins consisting of human IL-15 and human IL-15R   fused by flexible linkers that behave as potent super-agonists of the IL-15R  /   complex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Cytokines—Recombinant human IL-15 (rIL-15) was purchased from Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ). The Mo-7e myeloid leukemia (22) and TF-1 erythroleukemia human cell lines (ATCC CRL-2003) (kindly provided by Dr. Bruno Azzar  ne, IGR, Villejuif, France) were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, and 1 ng/ml granulocyte macrophage-colony stimulating factor (R&D Systems, Abington, UK). TF1-   cells (23) were cultured in the same medium supplemented with 250   g/ml Geneticin. The Kit 225 human T lymphoma cell line (24) (obtained from Dr. Doreen Cantrell, University of Dundee, UK) was cultured in RPMI 1640 medium containing 6% fetal calf serum, 2 mM glutamine, and 10 ng/ml rIL-2 (Chiron, Emeryville, CA). 32D   cells (25) (kindly provided by Dr. Warren Leonard, Bethesda, MD) were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 0.4 ng/ml mIL-3 (R&D Systems), 10   M 2-mercaptoethanol, 250   g/ml Geneticin.

sIL-15R  -IL-2, sIL-15R  -sushi-IL-2, and sIL-15R  -sushi-sIL-15R  -IL-2 was expressed in Chinese hamster ovary cells and prepared as described (26). A similar construction was made in which the sushi domain of IL-15R   (amino acids 1–66 of mature coding sequence) was linked to a molecule of human IL-2 (sIL-15R  -sushi-IL-2).

The sushi domain of IL15R   was amplified by PCR. PCR products were purified, digested with BamHI and HindIII (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and ligated into a pQE30 expression vector. Expression was performed in *Escherichia coli* SG13009 cells under isopropyl 1-thio-  -D-galactopyranoside induction. After cell lysis, inclusions bodies were washed, solubilized in 6 mM guanidine HCl, 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 20 mM imidazole, 150 mM sodium chloride, and 1 mM dithiothreitol. The IL-15R  -sushi was trapped in an nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen) equilibrated with the solubilization buffer plus 1 mM reduced glutathione and 0.2 mM oxidized glutathione. It was then refolded via a gradient from 6 to 0 M guanidine HCl in the column buffer (27) and eluted with 250 mM imidazole.

RLI and ILR Fusion Proteins—The constructions of the fusion proteins are shown in Fig. 2E. The human IL-15R  -sushi domain (amino acids 1–77) and human IL-15 were separated by linker 20 (SGGS-GGGSGGGSGGGSLQ) for RLI or by linker 26 (SGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ) for ILR. A sequence coding for the FLAG epitope and Factor Xa binding site (DYKDDDDKIEGR) was added

between the signal peptide and the coding sequences. The endogenous signal peptide of human IL-15R   was used for RLI and the signal peptide of bovine preprolactin for ILR. These constructions were inserted between the BamHI and the Hind III sites of a pFastBac 1 (Invitrogen) expression vector thus generating two expression vectors, which were recombined in baculovirus DNA using the Bac to Bac expression system (Invitrogen). The recombinant baculoviruses were used to infect SF9 cells, and fusion proteins were expressed in the SF 900 II medium and harvested 4 days post infection. The concentrations of the fusion proteins were measured by enzyme-linked immunosorbent assay with the anti-IL-15 monoclonal antibody 247 (R & D Systems) as the capture antibody and the anti-FLAG M2-peroxydase conjugate (Sigma) as the revealing antibody.

Surface Plasmon Resonance Studies—The SPR experiments were performed with a BIAcore 2000 biosensor (BIAcore, Uppsala, Sweden). rIL-15 was covalently linked to CM5 sensor chips, and the binding of increasing concentrations of sIL-15R  -IL-2, sIL-15R  -sushi-IL-2, or sIL-15R  -sushi was monitored. Analysis of sensorgrams was performed using BIAlogue kinetics evaluation software.

Proliferation Assays—The proliferative responses of Mo-7e, TF-1  , and Kit 225 cells to rIL-15, rIL-2, RLI, or ILR were measured by [³H]thymidine incorporation as described (19) after 4 h in cytokine-depleted medium, 48 h culture, and 16 h with [³H]thymidine.

Apoptosis—The annexin V assay was performed using a FACScan flow-cytometer and the Annexin V-FITC Apoptosis detection kit (BD Biosciences). After cytokine starvation, cells were seeded in multiwell plates at 5   10⁵ cells/well in 1 ml and cultured in medium supplemented with the various reactants (rIL-15, sIL-15R  -sushi, and RLI fusion protein). Data were acquired and analyzed using CellQuest software.

Binding Assays and Internalization—Labeling with [¹²⁵I]iodine of human rIL-15, sIL-15R  -sushi, and RLI fusion protein, as well as subsequent binding experiments, were performed as described previously (19). For internalization, cells were equilibrated at 4  C with labeled sIL-15R  -sushi or RLI, and the temperature was switched to 37  C. At different time intervals, two samples were washed and centrifuged. One of the cell pellets was treated with glycine-HCl buffer (0.2 M, pH 2.5), whereas the other was treated with phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 4  C for 5 min. After centrifugation, total ligand binding was determined from the pellet of the cells treated with PBS, whereas the membrane-bound and internalized fractions were determined, respectively, from the supernatant and pellet of cells treated with acid pH.

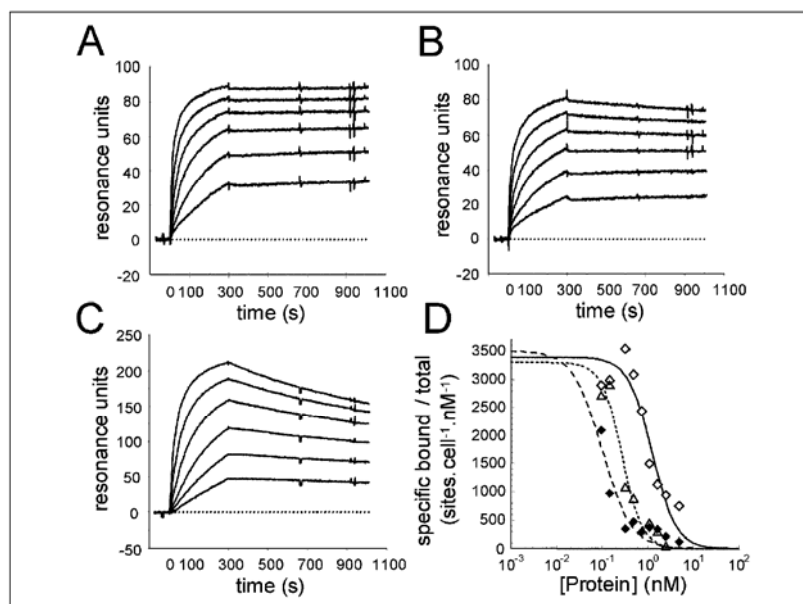
RESULTS

IL-15R   Binding to IL-15 Is Mainly Due to the Sushi Domain—In a previous study (28), we have shown that removal of the sushi domain encoded by exon 2 of IL-15R   resulted in a complete abrogation of IL-15 binding to membrane anchored IL-15R  , suggesting that the sushi domain was indispensable for binding. To directly measure the contribution of the sushi domain to IL-15 binding, soluble forms of IL-15R   containing the entire extracellular domain or only the N-terminal sushi domain were prepared and assayed for IL-15 binding in a competition assay and using SPR technology.

As shown in Fig. 1A, a sIL-15R  -IL-2 fusion protein produced in Chinese hamster ovary cells and consisting of the entire IL-15R   extracellular domain linked to a molecule of human IL-2 (used as a tag for purification) bound IL-15 with high affinity ($k_{on} = 3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 1.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 38 \text{ pM}$). A similar construction linking the sushi domain of IL-15R   to human IL-2 also bound IL-15 (Fig. 1B) but with a 10-fold lower affinity, mainly due to a more rapid off rate ($k_{on} =$

Agonist Effect of Soluble IL-15R α -sushi

FIGURE 1. Binding affinities of the various soluble IL-15R α proteins for IL-15. SPR sensorgrams of the binding (association and dissociation phases) of increasing concentrations of rIL-15 (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, and 100 nM) to immobilized sIL-15R α -IL-2 (A), sIL-15R α -sushi-IL-2 (B), or IL-15R α -sushi (C). D, competition studies of sIL-15R α -sushi ($\diamond$), sIL-15R α -IL-2 ($\blacklozenge$), or sIL-15R α -sushi-IL-2 ($\triangle$) with radioiodinated rIL-15 (200 pM) binding to TF-1 cells.



$3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{off}} = 1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 420 \text{ pM}$). A soluble sushi domain was also produced in *E. coli*. This sIL-15R α -sushi also bound IL-15 with a lower affinity ($k_{\text{on}} = 2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{off}} = 3.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 1.5 \text{ nM}$) (Fig. 1C). These results indicate that the sushi domain is responsible for most of the binding affinity of IL-15 but that it does not fully reconstitute the high affinity binding displayed by the full-length extracellular domain.

Soluble IL-15R α Proteins Inhibit IL-15 Binding to Membrane-anchored IL-15R α —The three soluble forms of IL-15R α were tested for their ability to compete with radioiodinated IL-15 for binding to IL-15R α expressed by the human cell line TF-1 that also expresses the IL-15R γ chain but not the IL-15R β chain (Fig. 1D). The three proteins completely inhibited IL-15 binding to TF-1 cells with IC_{50} values that were similar to the K_d values measured by the SPR technology: 100 pM (sIL-15R α -IL-2), 270 pM (sIL-15R α -sushi-IL-2), and 1.3 nM (sIL-15R α -sushi).

sIL-15R α -sushi Increases IL-15-driven Cell Proliferation through the IL-15R β / γ Complex—Because the soluble sushi domain was easily produced in *E. coli* in high yields, it was selected for all further studies. It was first tested on cell lines that only express the IL-15R β / γ complex (the human Mo-7e cell line and the mouse 32D β cell line that express endogenous mouse IL-15R γ chain and transfected human IL-15R β chain, respectively). As expected, the Mo-7e cell line proliferated in response to nanomolar concentrations of rIL-15 or rIL-2 (Fig. 2, A and B). Unexpectedly, addition of a fixed concentration of sIL-15R α -sushi (10 nM) to the assay increased the proliferative response to lower concentrations of rIL-15 by ~ 4 -fold. By itself, sIL-15R α -sushi did not induce any proliferative response (data not shown). Similar results were obtained for 32D β with a shift of ~ 10 -fold (data not shown). The specificity was assessed by the fact that sIL-15R α -sushi did not affect the rIL-2-driven proliferation of Mo-7e cells (Fig. 2B). Fig. 2C shows that sIL-15R α -sushi dose dependently (with an IC_{50} of 3.5 nM, similar to its K_d for IL-15) potentiated the effect of a fixed concentration of rIL-15 (1 nM) that alone induces only a low level of proliferation.

RLI and ILR Fusion Proteins Are Potent Inducers of Cell Proliferation through the IL-15R β / γ Complex—To evaluate whether the synergistic effect of sushi on IL-15 bioactivity could be transferred by a single molecule, molecular constructs encoding fusion proteins linking IL-15 and the sushi domain were elaborated. For the two constructions, a flexible linker was introduced between the C terminus of IL-15 and the N terminus of the sushi domain (ILR) or *vice versa* (RLI) (Fig. 2E). Molecular models illustrating the structures of these proteins are shown in Fig. 2F. These two fusion proteins were tested for their effect on the proliferation of Mo-7e cells. As shown in Fig. 2D, both proteins induced dose-dependent induction of Mo-7e cell proliferation, with EC_{50} s that were similar ($\sim 25 \text{ pM}$) and far lower than those of rIL-15 alone (3 nM), or of an equimolar mixture of rIL-15 plus sIL-15R α -sushi (0.9 nM). These results further confirm the synergistic effect of sIL-15R α -sushi on the actions of IL-15 and indicate that stabilizing the IL-15-sIL-15R α -sushi complex with a covalent linker markedly enhances this synergistic action.

sIL-15R α -sushi Increases IL-15-induced Prevention of Apoptosis, and RLI Efficiently Prevents Cellular Apoptosis—Following cytokine withdrawal, the fraction of apoptotic Mo-7e cells increased from 10 to 80% in 48 h (Fig. 3, A (panel a) and A (panel b)). When added at time zero, rIL-15 (5 nM) reduced this apoptosis to 70% (Fig. 3A, panel c). Alone, sIL-15R α -sushi (10 nM) had no effect (Fig. 3A, panel b). However, it markedly potentiated the anti-apoptotic effect of rIL-15 (35% apoptosis at 48 h, Fig. 3A, panel c). The synergistic effect of sIL-15R α -sushi on IL-15-mediated prevention of apoptosis was confirmed by a kinetic analysis (Fig. 3B) as well as by dose-response curves (Fig. 3C). rIL-15 acted with an IC_{50} of $\sim 1.5 \text{ nM}$, a value in agreement with the saturation of IL-15/ β / γ receptors. This IC_{50} was ~ 10 -fold lower (170 pM) in the presence of 10 nM sIL-15R α -sushi. The RLI fusion protein markedly prevented apoptosis (Fig. 3B). On a molar basis, it was even more active than the IL-15-sIL-15R α -sushi association, with an IC_{50} of $\sim 40 \text{ pM}$ (Fig. 3C).

Agonist Effect of Soluble IL-15R α -sushi

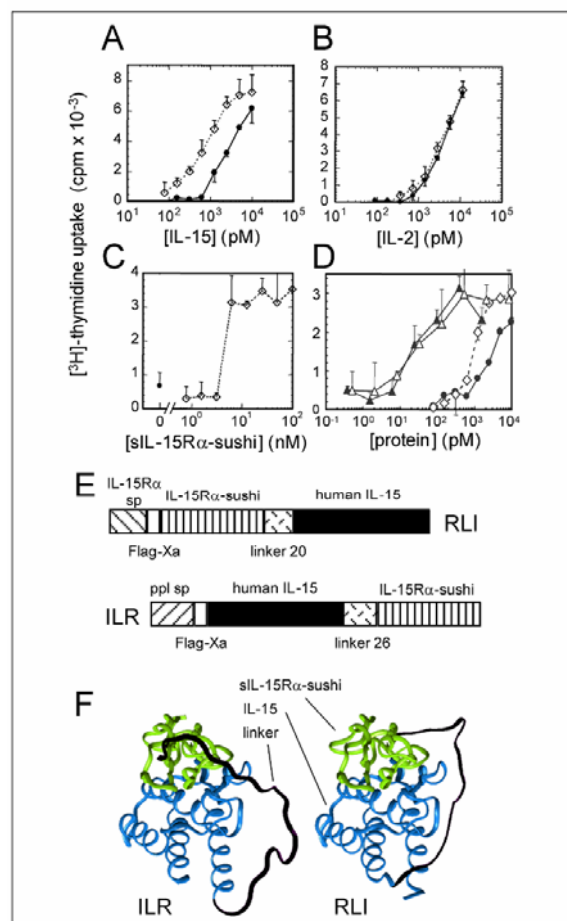


FIGURE 2. Effects on IL-15-induced proliferation through IL-15R β/γ . The proliferation of Mo-7e cells was evaluated by the incorporation of [3 H]thymidine. Cells were cultured with increasing concentrations of human rIL-15 (A) or human rIL-2 (B). In the absence (●) or presence (○) of a fixed concentration (10 nM) of sIL-15R α -sushi. C, cells were cultured in the presence of 1 nM rIL-15, without (●) or with increasing concentrations of sIL-15R α -sushi (○). D, cells were cultured with increasing concentrations of rIL-15 (●), an equimolar mixture of IL-15 and sIL-15R α -sushi (○), RLI (▲), or ILR fusion protein (△). E, molecular constructs used to express RLI and ILR fusion proteins. IL-15R α sp, human IL-15R α signal peptide; ppl sp, bovine prolactin signal peptide. F, three-dimensional model structures of the fusion proteins.

sIL-15R α -sushi Increases IL-15 Binding to Mo-7e Cells, and the RLI Fusion Protein Binds to and Is Internalized by Mo-7e Cells—As expected, Mo-7e cells bound IL-15 with intermediate affinity ($K_d = 13.5$ nM), with a maximal binding capacity of 800 sites/cell (Fig. 4A). The addition of sIL-15R α -sushi (10 nM) increased the affinity of IL-15 binding ($K_d = 7$ nM) without significantly affecting the maximal binding capacity (1180 sites/cell). When using a radioiodinated RLI fusion protein (Fig. 4B), we detected binding to a similar number of receptor sites (730 sites/cell), and the affinity of binding ($K_d = 780$ pM) was markedly higher than that of IL-15. Fig. 4C shows that RLI can be efficiently and rapidly internalized. The fraction of cell-bound radioactivity decreased within ~20 min and was accompanied by a concomitant increase in intracellular radioactivity.

sIL-15R α -sushi Does Not Affect IL-15-driven Cell Proliferation nor Inhibition of Apoptosis through the High Affinity IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ Complex—The human lymphoma cell line Kit 225 expresses endogenous IL-15R α ,

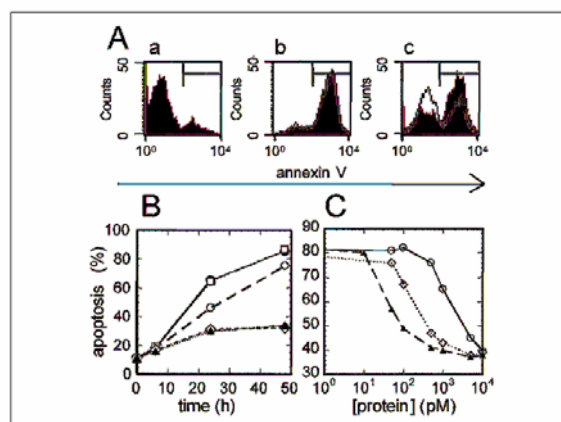


FIGURE 3. Effects on IL-15-induced prevention of apoptosis through IL-15R β/γ . Apoptosis was evaluated by Annexin V cell-surface expression using flow cytometry. In A: full histogram (a) represents annexin V staining on Mo-7e at the beginning of the experiment. Cells were cultured for 48 h, without (b) or with a fixed concentration of human rIL-15 (500 pM) (c), in the absence (full histogram) or presence of sIL-15R α -sushi (10 nM) (unbroken line). B, kinetics of Annexin V expression on Mo-7e cells in the absence of exogenous cytokine (●) or in the presence of rIL-15 (500 pM) (○), sIL-15R α -sushi (10 nM) (□), sIL-15R α -sushi (10 nM) plus rIL-15 (500 pM) (◇), or RLI (500 pM) (▲). C, Mo-7e cells were cultured with increasing concentrations of rIL-15, in the absence (○) or presence (◇) of a fixed concentration (10 nM) of sIL-15R α -sushi, or with increasing concentrations of RLI (▲).

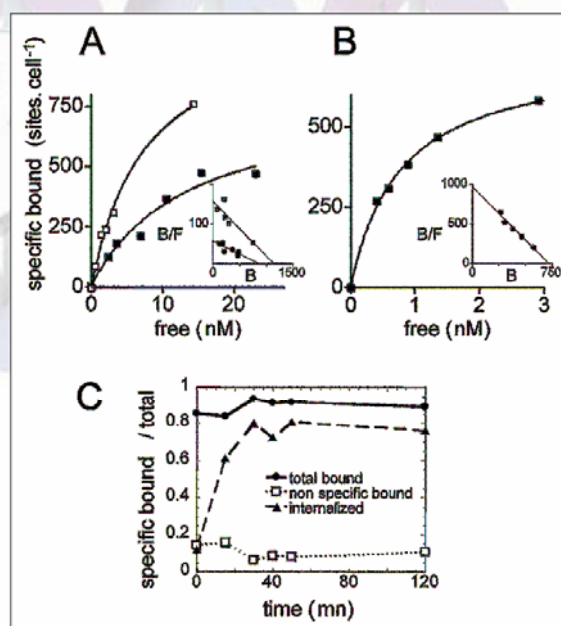


FIGURE 4. Agonistic effect of sIL-15R α -sushi on IL-15 binding to IL-15R β/γ : binding and internalization of RLI. A, binding of [125 I]-labeled IL-15 to Mo-7e cells in the absence (●) or presence of 10 nM sIL-15R α -sushi (□). B, binding of [125 I]-labeled RLI fusion protein. Scatchard plots are shown in insets. C, internalization of [125 I]-labeled RLI fusion protein (500 pM).

β , and γ chains, and the human TF-1 cell line expresses endogenous IL-15R α and γ chains plus the transfected human IL-15R β chain. Consequently, these cell lines proliferate in response to low, picomolar concentrations of IL-15, as shown in Fig. 5 (A and B) ($EC_{50} = 19$ pM and 21 pM, respectively). In contrast to what was found using Mo-7e or 32D β

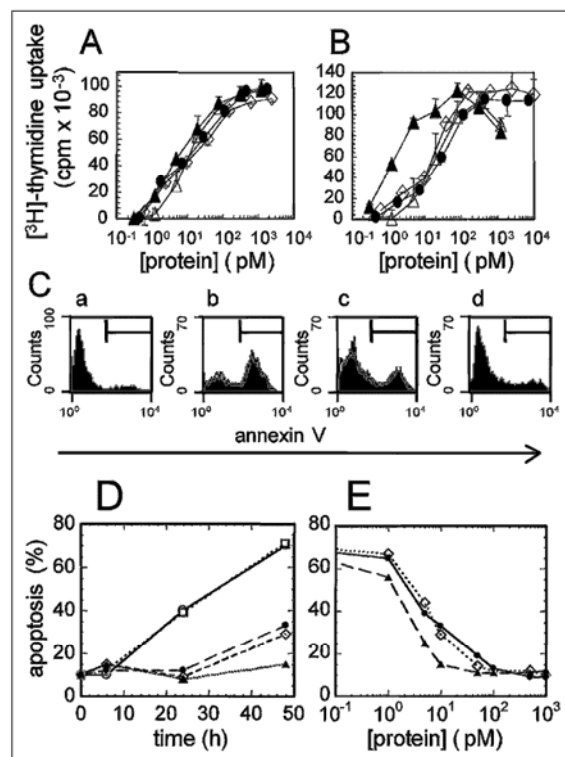


FIGURE 5. Effects on IL-15-induced cell proliferation and apoptosis through IL-15R α / β / γ receptors. [3 H]Thymidine incorporation by Kit 225 (A) and TF-1 β (B) cells cultured with increasing concentrations of rIL-15 (●), an equimolar mixture of rIL-15 and sIL-15R α -sushi (○), RLI (▲), or ILR fusion protein (△). In C: Annexin V staining of TF-1 β at the beginning of the experiment (a), at 48 h after culture without (b) or with a fixed concentration of human rIL-15 (500 pM) (c), in the absence (full histogram) or presence of sIL-15R α -sushi protein (10 nM) (unbroken line), or in the presence of 10 pM of RLI (d). D, kinetics of staining in the absence of exogenous cytokine (○) or in the presence of rIL-15 (10 pM) (●), sIL-15R α -sushi (10 nM) (□), sIL-15R α -sushi (10 nM) plus rIL-15 (10 pM) (◇), or RLI fusion protein (10 pM) (▲). E, staining at 48 h after culture with increasing concentrations of rIL-15, in the absence (●) or presence (○) of a fixed concentration (10 nM) of sIL-15R α -sushi, or with increasing concentrations of RLI fusion protein (▲).

cells, addition of equimolar concentrations of sIL-15R α -sushi to IL-15 did not significantly affected the IL-15 dose-response curve on either cell type. The ILR fusion protein was as active as rIL-15 on the two cell lines. The RLI was also as active as rIL-15 on Kit 225 cells but was ~16-fold more efficient (EC_{50} = 1.2 pM) than rIL-15 on TF-1 β cells.

The effects of sIL-15R α -sushi and RLI were further analyzed on TF-1 β cell apoptosis induced by cytokine deprivation. Histograms showing these effects are given in Fig. 5C, whereas the kinetics and dose responses of these effects are shown in Fig. 5D and E, respectively. rIL-15 dose and time dependently inhibited TF-1 β apoptosis. sIL-15R α -sushi alone had no effect and did not change the effect of IL-15 (IC_{50} = 6.5 pM for rIL-15 or sIL-15R α -sushi plus rIL-15). The ILR fusion protein was as active as rIL-15, whereas RLI was about three times more active (IC_{50} = 2.5 pM).

IL-15, sIL-15R α -sushi, and RLI Binding to TF1 β Cells—Insofar as IL-15R α -sushi did not affect IL-15 proliferation of TF-1 β , we examined its effect on IL-15 binding over a wide concentration range (Fig. 6A). Scatchard analysis of the saturation binding curve indicated the presence of two classes of IL-15 binding sites, compatible with the presence of a small number of high affinity binding sites (IL-15R α / β / γ com-

Agonist Effect of Soluble IL-15R α -sushi

plexes, K_d = 22 pM, B_{max} = 100 sites/cell) plus higher amounts of intermediate affinity binding sites (IL-15R β / γ complexes, K_d = 30 nM, 2800 sites/cell). sIL-15R α -sushi induced an increase in IL-15 binding that, according to Scatchard analysis, was mainly due to an increase in the affinity of IL-15 binding for the intermediate-affinity component (K_d = 3.5 nM). To more specifically test the effect of sIL-15R α on the high affinity component, its effect was analyzed on the binding of a low concentration of radiolabeled IL-15 (200 pM) that mainly targets the high affinity receptor. As shown in Fig. 6B, sIL-15R α -sushi, at concentrations of up to 25 nM, did not affect this binding.

The binding of radiolabeled sIL-15R α -sushi to TF-1 β cells (Fig. 6C) revealed a specific binding component that was strictly dependent on the presence of rIL-15. In the presence of 1 nM rIL-15, the K_d reflecting sIL-15R α -sushi binding was 3.5 nM, a value compatible with its affinity for IL-15, with a maximal binding capacity (3300 sites/cell) compatible with the number of IL-15 intermediate binding sites. As further shown in Fig. 6D, the radiolabeled sIL-15R α -sushi was efficiently internalized. Radiolabeled RLI fusion protein also bound to TF1 β cells (Fig. 6E). A single specific binding component was observed with a K_d of 250 pM and a maximal capacity (4000 sites/cell) again comparable to the number of IL-15 intermediate affinity binding sites. Once bound, the RLI was also efficiently internalized (Fig. 6F).

DISCUSSION

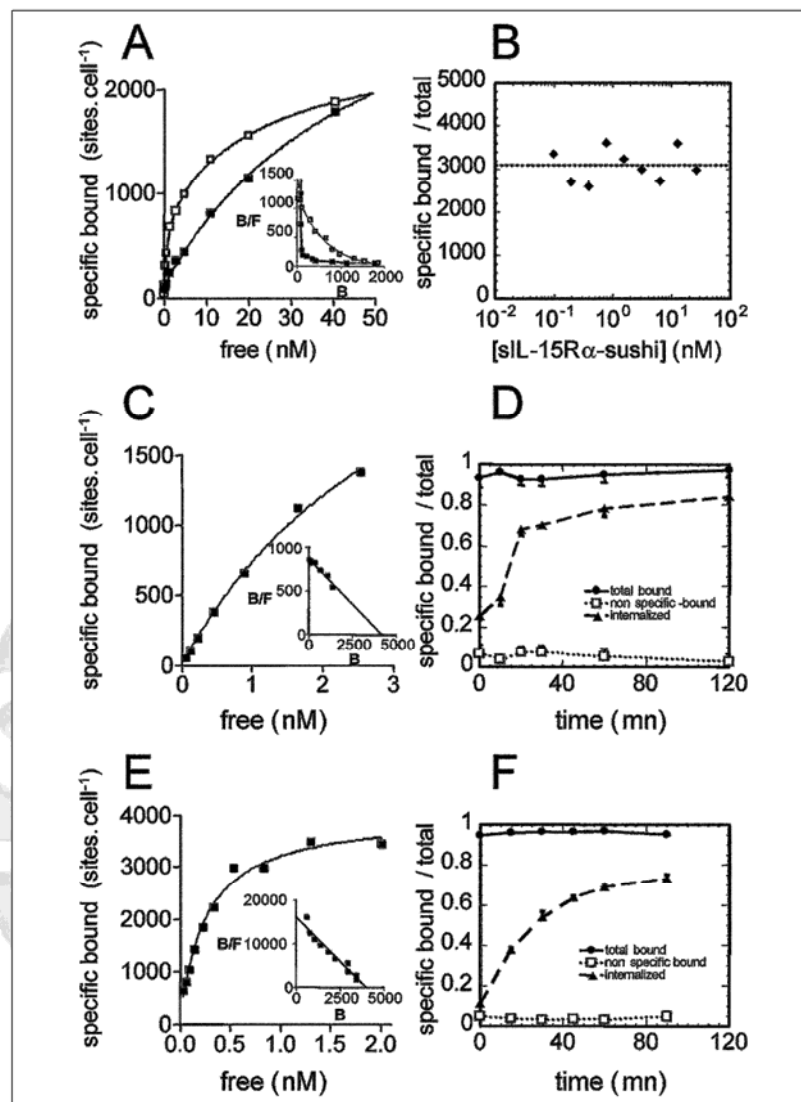
Deletion of the exon 2-encoded sushi domain of human IL-15R α was formerly shown to completely abrogate IL-15 binding, indicating the dispensable role of the sushi domain in cytokine recognition (28). Conversely, we show in this study that removal of the C-terminal tail (exons 3–5) of the extracellular part of IL-15R α (in the context of the sIL-15R α -IL-2 fusion protein) results in a 10-fold decrease in its binding affinity for IL-15, as seen by SPR, and a 3.5-fold decrease in its affinity as seen in a competition assay. In terms of thermodynamics, the 10-fold decrease in affinity was calculated to correspond to a 10% loss of the free energy of interaction of IL-15 with IL-15R α . Thus, the N-terminal structural domain encoded by exon 2 (sushi domain) bears most (90%) but not all of the IL-15 binding capacity. Recent data from our laboratory⁴ indicate that the domain encoded by exon 3 also contributes to IL-15 binding. The sIL-15R α -sushi produced in *E. coli* had an affinity that was 3- to 4-fold lower than that of sIL-15R α -sushi-IL-2 produced in Chinese hamster ovary cells. This difference cannot be explained by differences in the glycosylation status of the two proteins, inasmuch as the sushi domain does not contain any potential sites for *N*- or *O*-linked glycosylations (2). It is therefore likely to be due to differences in the structural folding of the two proteins.

While competing with IL-15 binding to membrane IL-15R α , sIL-15R α -sushi was found to exert agonistic effects by enhancing IL-15 action through the IL-15 β / γ complex. Studies on cells expressing either only intermediate affinity IL-15 receptors (Mo-7e and 32D β) or both high and intermediate affinity IL-15 receptors (TF-1 β and Kit 225) showed that the agonist action of sIL-15R α -sushi was specifically directed to the IL-15R β / γ complex: (i) it had no effect in the absence of IL-15; (ii) it bound to TF-1 β cells in the presence of IL-15 with a single affinity class of binding sites whose density was comparable to that of intermediate IL-15 binding sites; (iii) it increased the affinity of IL-15 for the IL-15R β / γ complex on Mo-7e cells and TF-1 β cells, whereas it did not affect the binding of IL-15 to the high affinity complex on TF-1 β cells; and (iv) it enhanced the efficiency of the biological actions of IL-15 (proliferation and prevention from apoptosis) through IL-15R β / γ on

⁴E. Mortier, unpublished results.

Agonist Effect of Soluble IL-15R  -sushi

FIGURE 6. Binding and internalization of sIL-15R  -sushi and RLI in TF-1   cells: effects of sIL-15R  -sushi on IL-15 binding. A, saturation binding curve of ¹²⁵I-labeled rIL-15 in the absence (  ) or presence of 10 nM sIL-15R  -sushi (  ). B, effect of increasing concentrations of sIL-15R  -sushi on the binding of a fixed concentration of radioiodinated rIL-15 (200 pM). C, saturation binding curve of ¹²⁵I-labeled sIL-15R  -sushi in the presence of 1 nM rIL-15 and D, subsequent internalization. E, saturation binding curve of ¹²⁵I-labeled RLI and F, subsequent internalization.



Mo-7e cells but had no effect on the same biological effects mediated through the high affinity receptor on TF-1   cells.

The functionality of this agonistic action was further supported by the fact that sIL-15R  -sushi, once bound in conjunction with IL-15 to IL-15R  /   on Mo-7e cells, was efficiently internalized within the cell. Its potency was strengthened in the context of the ILR and RLI fusion proteins: (i) RLI bound to IL-15R  /   with an affinity almost 20-fold higher than IL-15 itself; (ii) binding of RLI was followed by a rapid internalization of the fusion protein; and (iii) the RLI or ILR fusion proteins were much more potent than IL-15 in the functional assays. The dose-response curves of the two fusion proteins on Mo-7e cells were comparable to those of IL-15 through the high affinity receptor on Kit 225 or TF-1   cells, indicating that these fusion proteins almost fully reconstituted the high affinity response on cells only expressing the intermediate affinity receptor.

These results therefore indicate that sIL-15R  -sushi and IL-15 form a complex that cooperatively increases their binding affinities to the IL-15R  /   receptor. In contrast, sIL-15R  -sushi is not able to affect IL-15 binding and bioactivity once this latter is already associated with the high affinity membrane receptor complex. The possibility that sIL-15R  -sushi can still bind to IL-15 already engaged in this high affinity complex cannot, however, be excluded and could be tested with the availability of cells expressing mainly high affinity receptors, *i.e.* cells expressing similar levels of the three receptor subunits.

We have formerly shown that sIL-15R   expressed in COS cells or naturally produced by IL-15R  -positive cells, behaves as a powerful antagonist by binding IL-15 with high affinity ($K_d = 166$ pM) and inhibiting IL-15-induced proliferation of Kit 225 cells at low concentrations (IC₅₀ between 3 and 10 pM) (19). These results are in contrast with the present study showing that sIL-15R  -sushi has no effect on the prolif-

Agonist Effect of Soluble IL-15  -sushi

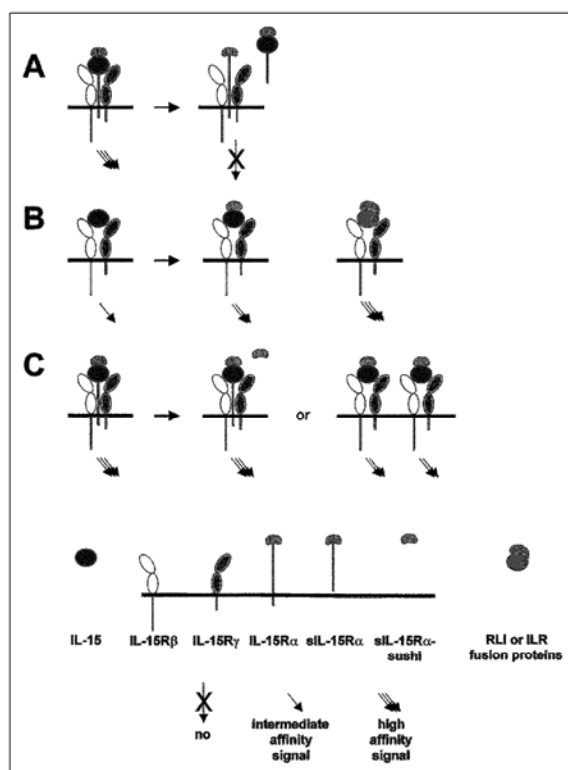


FIGURE 7. Proposed models for the differential effects of sIL-15   and sIL-15  -sushi. A, in the context of IL-15  /   receptors, sIL-15   competes with membrane IL-15   for binding IL-15. B, in the context of IL-15  /   receptors, sIL-15  -sushi forms a complex with IL-15 that activates the IL-15  /   complex more efficiently than IL-15 alone. The RLI or ILR fusion proteins amplify this agonistic effect. C, in the context of IL-15  /   receptors, sIL-15  -sushi is not efficient in competing with membrane IL-15  , or it competes with membrane IL-15   and the complex of sIL-15  -sushi with IL-15 activates excess IL-15  /   complexes as in B.

eration of Kit 225 cells or of TF-1   cells and acts as an agonist on Mo-7e cells. Another contrasting result was reported in a recent study showing that a mixture of rIL-15 and a recombinant human sIL-15   (lacking exon 3)-Fc homodimeric chimera could have an anti-apoptotic effect on Mo-7e cells, whereas rIL-15 alone at the same dose had no effect (29). In an attempt to explain these differences of action, a model is proposed in Fig. 7. In this proposal, in the context of the high affinity IL-15 response, sIL-15   acts as a competitor of membrane IL-15   for the recruitment of IL-15 (Fig. 7A). The complex of sIL-15  -sushi with IL-15, on the contrary, is able to associate with membrane IL-15  /   and enhance the biological effect of IL-15 (Fig. 7B). There are two ways of explaining the absence of the inhibitory effect of sIL-15  -sushi in the context of the high affinity receptor (Fig. 7C). In the first, sIL-15  -sushi has a lower affinity for IL-15 ($K_d = 1.5$ nM, this report) than has sIL-15   ($K_d = 160$ pM) (19) and, therefore, is not able to efficiently compete with membrane IL-15   on Kit 225 or TF-1   cells. In the second, sIL-15  -sushi can compete with membrane IL-15   to bind IL-15 and form complexes with IL-15  /   similar to those formed on Mo-7e cells. Such complexes are less efficient, because they need higher concentrations of IL-15 to be activated ($IC_{50} = 750$ pM instead of 20 pM for high affinity receptors, Figs. 2 and 5). However, given the fact that IL-15  /   are in excess of IL-15   in Kit 225 or TF-1   cells, the lower efficiency of such complexes could be compensated for by their higher

density (~3000 intermediate affinity receptors instead of 100 high affinity receptors on TF-1   cells, Fig. 6). This would result in no observable changes in terms of biological effects. Our observation that sIL-15  -sushi does not affect IL-15 high affinity binding on TF-1   cells (Fig. 6B) is, however, in favor of the first possibility. The functional differences between sIL-15   and sIL-15  -sushi indicate that the C-terminal tail of sIL-15   plays a crucial role in competing with membrane IL-15   and hence in the antagonistic action of sIL-15  . This tail would either impede soluble IL-15   association with IL-15  /   or allow such an association but result in a functionally inappropriate conformation of IL-15  /  . A similar mechanism has been proposed in the case of a soluble common    chain (30). The inhibitory activity of this soluble    chain (corresponding to the entire extracellular part of the    chain) was abolished by removal of its C-terminal part or by mutations of the WSXWS motif, two regions not involved in cytokine binding.

The agonistic effects of sushi are reminiscent of the agonistic effects described for soluble receptors within the extended IL-6 family of cytokines (namely sIL-6R, sIL-11R, sCNTFR, and the IL-12p40 subunit) (31). However, such an agonistic action in the case of the IL-15R could not be anticipated given that all soluble receptors so far described within the    family (sIL-2R  , sIL-2R  , and sIL-4R), and sIL-15   itself, behave as cytokine antagonists (19, 32). The present results therefore identify the soluble sushi domain of IL-15   as an unexpected and efficient agonist within this family. It would be interesting to evaluate whether such an agonistic activity can be similarly obtained with a sIL-2R  -sushi protein.

The concept of cytokine trans-signaling was initially used in the case of IL-6, where soluble IL-6R was shown to enhance the sensitivity of IL-6-responsive cells to the action of IL-6 and to render cells that express gp130 but not membrane IL-6R responsive to IL-6 (33). This concept has been extended to other members of the gp130 cytokine family (IL-11R, CNTFR, and CLC) (34–37). In the case of IL-15, a mechanism of cytokine transpresentation has been shown (12) in which IL-15 produced by monocytes/dendritic cells is associated to membrane IL-15   expressed by the same cells and can stimulate the proliferation of IL-15  /  ⁺IL-15  ⁺ bystander cells. Recent reports have suggested that transpresentation is a dominant mechanism *in vivo* and necessitates expression of IL-15 and IL-15   by the same cells (13, 14, 38, 39). It bears some similarity with the trans-signaling concept, in that trans-presented IL-15/IL-15   complexes can sensitize IL-15  /  ⁺IL-15  ⁺ cells to physiological concentrations of IL-15. In this respect, membrane IL-15   acts as an agonist of IL-15 action by increasing its avidity for the IL-15  /   complex and the efficiency of signaling (12). Our data show that sIL-15  -sushi behaves similarly, sensitizing IL-15  /  ⁺IL-15  ⁺ cells to the actions of IL-15. This suggests that the sushi domain of membrane IL-15   is crucial for transpresentation. We have shown that sIL-15  , produced by IL-15  -expressing cells and encompassing the entire extracellular part of IL-15  , is inhibitory to the actions of IL-15 (19) and likely constitutes a negative feedback mechanism that limits the biological effects of IL-15. In contrast, the sIL-15  -sushi described in this study displays an agonistic effect. If such soluble sushi is generated by IL-15  -expressing cells, it could participate in the IL-15 transpresentation mechanism. The existence of such naturally produced soluble sushi domains has not yet been described but is supported by the facts that (i) different isoforms of the membrane IL-15   have been described, including some that lack the tail (encoded by exons 3–5) linking the sushi domain to the transmembrane domain (3, 28, 40) and (ii) generation of soluble counterparts for some of them by shedding has been demonstrated (19). Thus, sIL-15   and sIL-15  -sushi could have opposing regulatory effects and, as such,

Agonist Effect of Soluble IL-15R α -sushi

participate in both controlling the magnitude and duration of IL-15-mediated biological actions.

A fusion protein (hyper-IL-6) consisting of the sIL-6R C terminus fused by means of a flexible linker to the N terminus of IL-6 has been described as a novel approach to render the IL-6/sIL-6R complex more stable and more active than the combination of unlinked IL-6 and sIL-6R (41). A similar approach has also been used in the case of IL-11 (34). We show that this approach is also valid in the case of IL-15. A molecular model of IL-15 with the sushi domain was generated (Fig. 2)⁵ that helped to design a flexible linker enabling to link the C terminus of IL-15 to the N terminus of sushi (ILR fusion protein) or *vice versa* (RLI fusion protein). The model also predicted that the linker would not mask the areas of IL-15 that have been shown to be involved in binding to the IL-15R β and γ chains. As discussed above, the two fusion proteins turned out to be much more active than IL-15 and the combination of IL-15 plus sIL-15R α -sushi in activating the IL-15R β / γ complex on Mo-7e cells. When used on TF-1 β cells, and in the context of activation of the high affinity receptor, the ILR fusion protein was as active as IL-15, and the RLI fusion protein was even 10-fold more active, with an EC₅₀ as low as 1.2 pM in inducing cell proliferation. Due to their high activity, these hyper-IL-15 fusion proteins appear to constitute valuable tools for the expansion of lymphocyte subsets, and especially those (NK and CD8 memory T cells) for which transpresentation of IL-15 has been suggested to be the physiological activating process (13). Such fusion proteins might therefore be very efficient adjuvant molecules in therapeutic strategies aiming at curing patients with cancer, immunodeficiencies, or infectious diseases.

REFERENCES

- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., and Ahdieh, M., *et al.* (1994) *Science* **264**, 965–968
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anderson, D. (1994) *EMBO J.* **13**, 2822–2830
- Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Shapiro, D. N., Morris, S. W., Park, L. S., and Cosman, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29862–29869
- Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kury, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4935–4939
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M. A. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1395–1403
- Wilkinson, P. C., and Liew, F. Y. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 1255–1259
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., and Peschon, J. J. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 771–780
- Lodolce, J. P., Burkett, P. R., Boone, D. L., Chien, M., and Ma, A. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 1187–1194
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11445–11450
- Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., and Marrack, P. (2000) *Science* **288**, 675–678
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. (2001) *Nat. Med.* **7**, 114–118
- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y. (2002) *Immunity* **17**, 537–547
- Burkett, P. R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Ma, A., and Boone, D. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4724–4729
- Schluns, K. S., Nowak, E. C., Cabrera-Hernandez, A., Puddington, L., Lefrançois, L., and Aguila, H. L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5616–5621
- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y. (2005) *Blood* **105**, 721–727
- Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B., and Campbell, I. D. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 717–725
- Schulz, O., Sewell, H. F., and Shakib, F. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 271–275
- Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C., and Lin, R. H. (2001) *Cancer Res.* **61**, 237–242
- Mortier, E., Bernard, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2004) *J. Immunol.* **173**, 1681–1688
- Ruchatz, H., Leung, B. P., Wei, X. Q., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (1998) *J. Immunol.* **160**, 5654–5660
- Smith, X. G., Bolton, F. M., Ruchatz, H., Wei, X., Liew, F. Y., and Bradley, J. A. (2000) *J. Immunol.* **165**, 3444–3450
- Meazza, R., Basso, S., Gaggero, A., Detotero, D., Trentin, L., Pereno, R., Azzarone, B., and Ferrini, S. (1998) *Int. J. Cancer* **78**, 189–195
- Farner, N. L., Gan, J., de Jong, J. L., Leary, T. P., Fenske, T. S., Buckley, P., Dunlap, S., and Sondel, P. M. (1997) *Cytokine* **9**, 316–327
- Hori, T., Uchiyama, T., Tsudo, M., Umadome, H., Ohno, H., Fukuhara, S., Kita, K., and Uchino, H. (1987) *Blood* **70**, 1069–1072
- Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S., and Leonard, W. J. (1994) *Nature* **369**, 330–333
- Bernard, J., Harb, C., Mortier, E., Quemener, A., Meloen, R. H., Vermot-Desroches, C., Wijdeness, J., van Dijken, P., Grotzinger, J., Sloodstra, J. W., Plet, A., and Jacques, Y. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 24313–24322
- Matsumoto, M., Misawa, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Hayashi, H., and Kobayashi, Y. (2003) *Protein Expr. Purif.* **31**, 64–71
- Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A., and Jacques, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26978–26984
- Giron-Michel, J., Giuliani, M., Fogli, M., Brouty-Boye, D., Ferrini, S., Baychelier, F., Eid, P., Lebousse-Kerdiles, C., Durali, D., Biassoni, R., Charpentier, B., Vasquez, A., Chouaib, S., Caignard, A., Moretta, L., and Azzarone, B. (2005) *Blood* **106**, 2302–2310
- Meissner, U., Blum, H., Schnare, M., Rollinghoff, M., and Gessner, A. (2001) *Blood* **97**, 183–191
- Jones, S. A., and Rose-John, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 251–263
- Heaney, M. L., and Golde, D. W. (1998) *J. Leukoc. Biol.* **64**, 135–146
- Rose-John, S., and Heinrich, P. C. (1994) *Biochem. J.* **300**, 281–290
- Pflanz, S., Tacke, L., Grotzinger, J., Jacques, Y., Minvielle, S., Dahmen, H., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (1999) *FEBS Lett.* **450**, 117–122
- Davis, S., Aldrich, T. H., Ip, N. Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P. S., Curtis, R., Panayotatos, N., and Gascan, H. (1993) *Science* **259**, 1736–1739
- Karow, J., Hudson, K. R., Hall, M. A., Vernalis, A. B., Taylor, J. A., Gossler, A., and Heath, J. K. (1996) *Biochem. J.* **318**, 489–495
- Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, L., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 867–872
- Sandau, M. M., Schluns, K. S., Lefrançois, L., and Jameson, S. C. (2004) *J. Immunol.* **173**, 6537–6541
- Koka, R., Burkett, P. R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Lodolce, J. P., Boone, D. L., and Ma, A. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 977–984
- Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., Krause, H., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (2003) *J. Immunol.* **170**, 5045–5055
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1997) *Nat. Biotechnol.* **15**, 142–145

⁵ A. Quemener, unpublished results.

III. IL-15, sIL-15R α , complexe IL-15/sIL-15R α et pathologies.

A. Introduction.

L'expression de l'IL-15 est finement régulée dans des conditions physiologiques et un certain nombre de maladies ont été décrites en association avec une activation ou un défaut du système IL-15. Parmi ces maladies, on peut citer les cancers, les maladies autoimmunes, inflammatoires ou infectieuses, les rejets de greffes, ou encore les immunodéficiences. Les transcrits de l'IL-15R α étant exprimés dans de nombreux types cellulaires et tissus, et le sIL-15R α possédant une forte affinité et efficacité de blocage pour l'IL-15, ce récepteur soluble peut exercer un rôle important dans un contexte physiologique comme pathologique. L'IL-15 a été détectée dans des liquides biologiques de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin (la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique), les maladies inflammatoires pulmonaires (sarcoïdose), ainsi que certains cancers. Les méthodes de détection mises au point dans mon travail de thèse (mesures du sIL-15R α , de l'IL-15 et du complexe) seront des outils importants permettant de mieux analyser la régulation du système IL-15 dans de telles pathologies.

B. Mise en évidence d'un complexe IL-15/sIL-15R α dans le surnageant de COS-7 double transfectées.

1. Méthodes de détection du sIL-15R α , de l'IL-15 et du complexe.

L'identification du récepteur soluble, sIL-15R α , a été possible par la mise au point d'une technique RIA sensible, avec une limite de détection de 1 pM. Un premier anticorps polyclonal (AF247, R&D) est utilisé afin de piéger le sIL-15R α présent dans les surnageants ou les liquides biologiques. Le second anticorps monoclonal (M161, Medarex) est radiomarké à l' ^{125}I et sert à la révélation. Le M161 réagit avec un épitope de l'IL-15R α impliqué dans l'interaction avec l'IL-15 en bloquant sa liaison. Ainsi, cet RIA ne permet la détection que du sIL-15R α "libre", non lié à une molécule d'IL-15. Deux autres types de

RIA ont été mis au point, l'un permettant la détection de l'IL-15, l'autre, la détection du complexe formé d'une molécule d'IL-15 avec une molécule de sIL-15R α (**Figure 15**). Fort de ces différents outils, il nous est permis de cribler différents types de liquides biologiques humains, sains ou pathologiques afin de mesurer l'existence de ces différentes molécules *in vivo*, ce qui peut permettre d'évaluer leurs rôles à la fois dans un contexte physiologique, dit "normal" et dans différentes situations pathologiques (degré d'évolution, réponse à différents traitements).

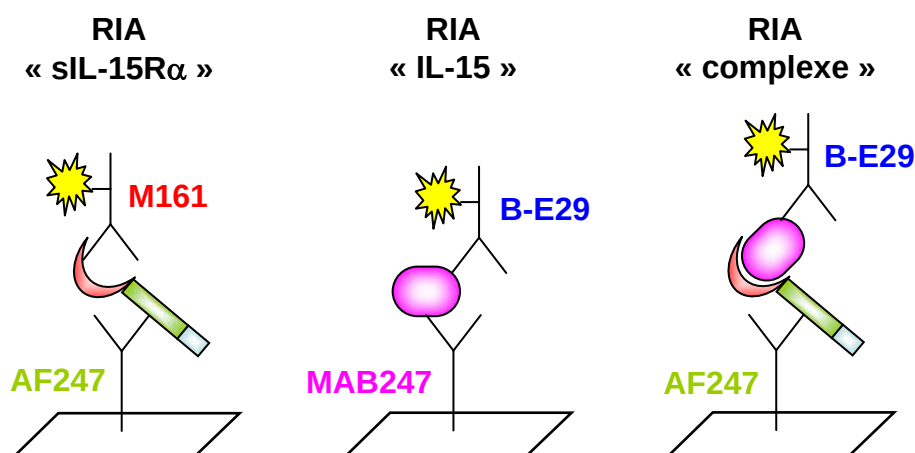


Figure 15 : Les Différents RIAs de Détection du sIL-15R α , de l'IL-15 et du Complexe. Les sensibilités des différents RIAs sont, respectivement, de 1 pM, 2 pM et 4 pM. (Ac anti-IL-15 : B-E29 et MAB247; Ac anti-IL-15R α : M161 et AF247)

2. Détection d'un complexe IL-15/sIL-15R α dans les surnageants de COS-7 exprimant l'IL-15 et l'IL-15R α membranaire.

Les cellules COS-7 ont été transfectées pour exprimer soit l'IL-15 (COS IL-15), soit la chaîne IL-15R α membranaire (COS IL-15R) soit les deux à la fois (COS IL-15/15R). Les expressions de l'IL-15 et de l'IL-15R α à la surface et à l'intérieur des cellules ont été mesurées par cytométrie de flux. Les surnageants des trois types de cellules ont été testés dans les différents RIAs (**Tableau 3**).

		COS IL-15R	COS IL-15	COS IL-15/15R
IL-15R α (M161)	membranaire	+ (2,70)	- (1,09)	+/- (1,46)
	intracellulaire	+ (4,27)	- (1,00)	- (1,18)
sIL-15R α	surnageant	+	-	-
IL-15 (B-E29)	membranaire	- (1,01)	- (1,31)	+ (2,19)
	intracellulaire	- (1,33)	+ (1,93)	+ (9,98)
IL-15	surnageant	-	+	+
Complexe	surnageant	-	-	+

Tableau 3 : Expression de l'IL-15 et de la Chaîne IL-15R α à la Surface, à l'Intérieur et dans les Surnageants de Culture des Cellules COS Transfectées. Les cellules COS-7 ont été transfectées de façon transitoire pour exprimer l'IL-15 et/ou l'IL-15R α .

48h après la transfection, les cellules sont décollées au PBS / BSA / EDTA puis marquées par les anticorps anti-IL-15 (B-E29) ou anti-IL-15R α (M161) avec ou sans agent perméabilisant (saponine). La fixation non-spécifique a été déterminée à l'aide d'un anticorps irrelevant, et la liaison des anticorps a été révélée en cytométrie de flux par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Les moyennes géométriques de fluorescence ont été calculées, et les rapports entre le marquage spécifique et non-spécifique sont représentés dans le tableau ci-dessus.

48h après la transfection, les surnageants de culture ont été récoltés. L'anticorps de capture (5 μ g/ml) a été fixé au fond des plaques en plastique, et les puits ont été saturés par de la BSA. L'anticorps immobilisé a été incubé en présence des surnageants de culture des différentes cellules transfectées. Les protéines (IL-15, sIL-15R α et complexe) fixées à l'anticorps immobilisé, ont été incubées avec l'anticorps de révélation radiomarké à l'¹²⁵I (1 nM) et les radioactivités liées et libres ont été mesurées (+ présence dans le surnageant; - absence ou en dessous du seuil de détection).

Les cellules COS IL-15R présentent le récepteur à la membrane (ratio de moyenne géométrique du marquage spécifique versus non spécifique, $r = 2,70$). Le dosage RIA "sIL-15R α " des surnageants de ces cellules est positif, témoignant du relargage du récepteur soluble à partir de la chaîne membranaire. Dans les cellules COS IL-15, l'IL-15 n'est détectable par l'Ac B-E29 qu'à l'intérieur des cellules ($r = 1,93$) et est sécrétée dans le surnageant.

Les cellules COS IL-15/15R expriment le récepteur à la surface à un niveau plus faible que les cellules COS IL-15R ($r = 1,46$). Le marquage intracellulaire est négatif et aucune molécule de sIL-15R α n'est détectable dans les surnageants. Au contraire, l'IL-15 est détectable à la surface ($r = 2,19$) ainsi qu'à l'intérieur ($r = 9,98$) et dans les surnageants des cellules COS doublement transfectées. L'Ac M161, utilisé pour détecter l'IL-15R α , reconnaît sur l'IL-15R α la zone de fixation de l'IL-15. La faible détection (membrane) voire l'absence de détection (intracellulaire, surnageant) de l'IL-15R α pourrait être due au fait que la majorité de l'IL-15R α est associée à l'IL-15, empêchant le M161 de se fixer. Au contraire, l'Ac B-E29 est capable de reconnaître l'IL-15 fixée à l'IL-15R α et le RIA "IL-15" dose non seulement l'IL-15 libre mais aussi l'IL-15 fixée au sIL-15R α . L'hypothèse du complexe est confirmée par sa détection dans le surnageant des cellules COS IL-15/15R avec le RIA "complexe". Ce RIA n'est positif que pour les surnageants des cellules COS IL-15/15R, et donc ne dose pas les protéines libres.

C. Mise en Evidence du sIL-15R α et d'IL-15 dans les sérums de patients atteints de Maladie de Crohn.

Des travaux précédents ont montré la présence d'IL-15 dans certaines maladies inflammatoires de l'intestin, comme la maladie de Crohn (MC), dans sa phase aiguë, et la rectocolite hémorragique (Kirman and Nielsen 1996). Ainsi, en collaboration avec le service de gastroentérologie du CHU de Nantes (Dr Arnaud Bourreille), nous avons dosé dans un premier temps, le récepteur soluble, sIL-15R α et l'IL-15 dans les sérums des patients par les RIAs mis au point. Nous avons testé 11 patients atteints de MC traités par des Ac anti-TNF α (Rémicade[®], infliximab), à temps zéro (MC 0) puis après 6 semaines de traitement (MC 6). En parallèle, nous avons dosé les sérums de 40 témoins "sains" (**Figure 16**).

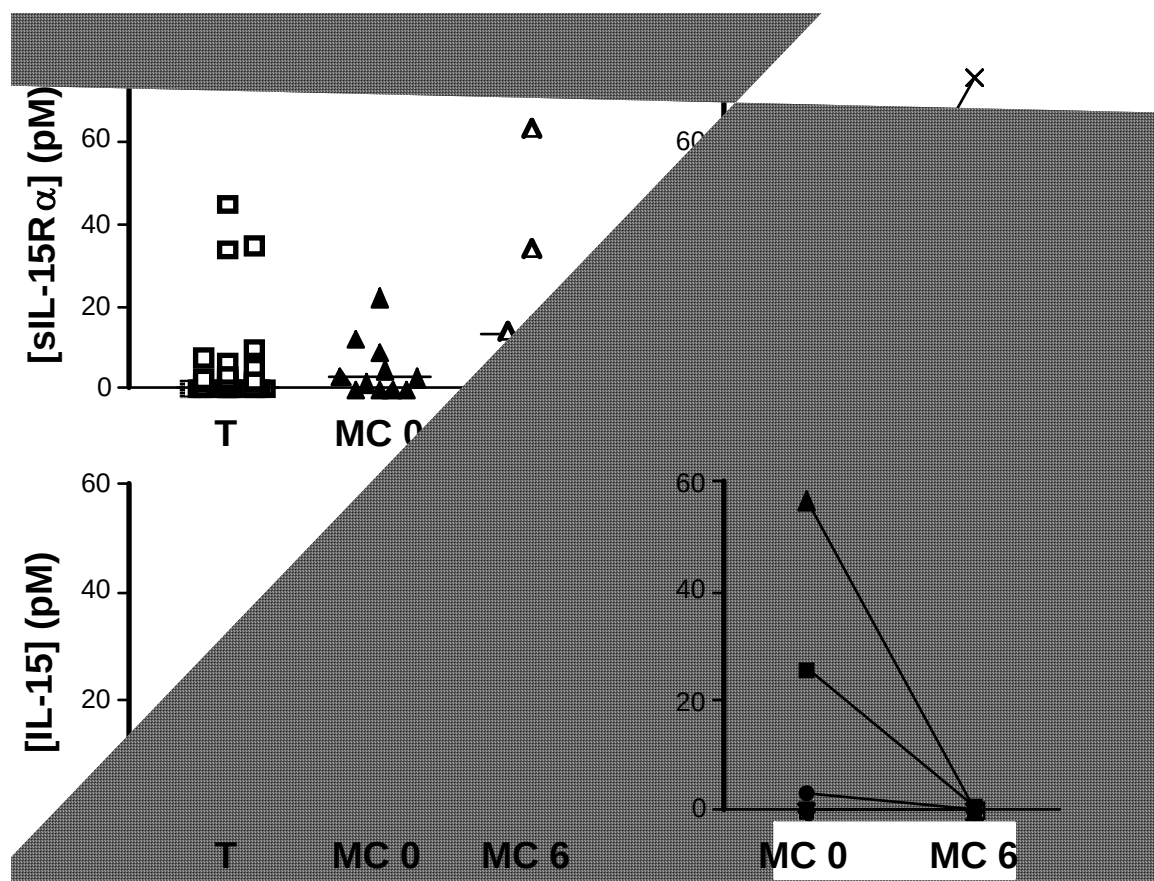


Figure 16: Dosages du sIL-15R α et de l'IL-15 chez 11 Patients Atteints de la Maladie de Crohn avant Traitement et après 6 Semaines de Traitement anti-TNF α (Rémicade®). (T: Témoins "sains"; MC 0: patients Crohn avant traitement; MC 6: patients Crohn après 6 semaines de traitement). Les barres horizontales représentent les médianes. Les graphiques de droite montrent l'appariement des dosages. Les résultats ont été analysés par les tests statistiques de Mann & Whitney ou de Wilcoxon suivant les conditions.

Après l'analyse statistique selon Mann & Whitney (test non apparié), on observe que les taux de sIL-15R α de MC 0 ne sont pas significativement différents ($p = 0,1087$) des taux retrouvés chez les témoins. Au contraire, le niveau de sIL-15R α de MC 6 est très significativement différent de celui dosé chez les témoins ($p = 0,0017$). De plus, l'analyse statistique de Wilcoxon, tenant compte de l'appariement des dosages (pour le même patient, on a un dosage à 0 et 6 semaines), montre que les niveaux de sIL-15R α de MC 0 et de MC 6 sont significativement différents ($p = 0,0195$) indiquant une augmentation significative du taux de sIL-15R α au cours du traitement par Ac anti-TNF α .

On observe une tendance inverse pour les taux d'IL-15. Ainsi, avant le traitement, le niveau d'IL-15 chez les patients atteints de MC 0 est significativement supérieur aux

témoins T ($p = 0,0117$, Mann & Whitney). Mais, après 6 semaines (MC 6), ce taux n'est pas différent de celui des témoins ($p = 0,4464$). L'analyse de Wilcoxon révèle que le niveau d'IL-15 est significativement plus élevé chez les patients avant traitement par rapport aux patients après 6 semaines de traitement ($p = 0,013$). Donc, on observe une diminution significative du taux d'IL-15, libre et/ou complexée au récepteur soluble, au cours du traitement par Rémicade®.

Il semble donc, que le récepteur soluble jouerait un rôle dans la maladie mais des analyses plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer l'implication du sIL-15R α dans l'évolution de la maladie au cours du traitement par Rémicade®. Cependant, une tendance significative semble ressortir selon laquelle l'IL-15 serait présente à de plus fortes doses lors de la phase aigüe de la maladie et sa quantité diminuerait après traitement des patients par des Ac anti-TNF α (Rémicade®). Inversement, le sIL-15R α , non significativement plus élevé pendant la phase aigüe, aurait quant à lui plutôt tendance à augmenter sous traitement.

DISCUSSION

De nombreux récepteurs de cytokines ont été mis en évidence. Ils agissent en tant que modulateurs de la réponse de la cytokine. L'IL-15 et l'IL-2 présentent une certaine redondance fonctionnelle *in vitro*. Cette redondance s'explique en partie par le fait qu'elles partagent les sous-unités transductrices IL-2R β et γ_c . Leur spécificité est conférée par une chaîne privée, la chaîne réceptrice α . Une forme soluble de la chaîne α du récepteur de l'IL-2, sIL-2R α , a été découverte et agit en tant qu'antagoniste de l'action de l'IL-2 à de fortes concentrations. Au cours de cette étude nous avons recherché à savoir si, à l'instar de ce qui avait été décrit pour le système IL-2, une forme soluble de la chaîne spécifique du récepteur à l'IL-15 pouvait exister. Une telle forme soluble devrait avoir un rôle important dans le système déjà hautement régulé de l'IL-15.

Mise en évidence du sIL-15R α : de l'in vitro à l'in vivo.

La découverte d'une forme soluble du récepteur de l'IL-15, sIL-15R α , a été possible grâce à la mise au point d'une technique de dosage sensible RIA. Le M161, qui est l'anticorps radiomarqué nécessaire à la détection, présente un épitope impliqué dans la zone de liaison de l'IL-15 et bloque l'interaction cytokine/récepteur. Ainsi, seul le sIL-15R α libre, c'est-à-dire, non complexé avec l'IL-15 endogène est dosé. Le sIL-15R α a été mis en évidence, dans un premier temps, dans des surnageants de culture de COS-7 transfectées par l'ADN complémentaire codant pour la forme totale de la chaîne IL-15R α sans stimulation. Après traitement des cellules à la PMA ou à la ionomycine, la quantité de sIL-15R α dans les surnageants de culture est accrue.

Différentes lignées cellulaires humaines exprimant l'IL-15R α membranaire ont été testées (A172: lignée de glioblastome, TF-1: lignée érythroleucémique, Kit 225: lignée de lymphome). Toutes ces lignées présentent dans leur surnageant de culture du récepteur soluble et donc constituent une source potentielle de sIL-15R α *in vivo*. Le PMA active la libération de différents récepteurs de cytokine dont le IL-15R α , indiquant que la voie de la protéine kinase C (PKC) est impliquée dans ce processus (Mullberg *et al.* 1992). La mobilisation du calcium par la ionomycine stimule également la libération de l'IL-15R α comme décrit précédemment pour l'IL-6R α (Jones *et al.* 1998). L'IL-1 β et le TNF- α qui activent la voie PKC et induisent la MMP-9, stimulent aussi le relargage du sIL-15R α (Esteve *et al.* 2002).

Fort de l'outil RIA mis au point, nous avons pu débiter une étude chez les patients atteints de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire de l'intestin. Nos résultats

préliminaires montrent l'existence du sIL-15R α $\sim$ 1 μ g/ml *in vivo* dans le sérum, ce qui suggère un rôle potentiel du système IL-15 dans cette maladie.

Génération du sIL-15R α par coupure protéolytique.

Deux mécanismes physiologiques principaux ont été décrits quant à la génération de récepteur soluble: le clivage protéolytique de la forme membranaire et la synthèse à partir d'ARN messager de la forme soluble issu d'un épissage alternatif (Fernandez-Botran *et al.* 1996). Trois observations montrent que le sIL-15R α nouvellement mis en évidence est issu d'un clivage protéolytique. En effet, plusieurs études antérieures ont décrits différents transcrits issus d'un épissage alternatif codant pour diverses formes membranaires de l'IL-15R α mais aucune ne montre l'existence d'un transcrit codant pour une forme soluble (Anderson *et al.* 1995; Dubois *et al.* 1999; Bulanova *et al.* 2003). De plus, la stimulation des cellules pour la production de sIL-15R α est accompagnée par une diminution de l'expression de la forme membranaire à la surface des cellules. Enfin, lors des expériences de transfection des cellules COS-7 par l'ADN complémentaire codant pour la forme totale, le sIL-15R α a été détecté par RIA dans les surnageants de culture. Cette forme soluble présente un poids moléculaire de 42k Da, 13 kDa plus faible que la forme membranaire de 55 kDa. Dans ces expériences de transfection, les mécanismes d'épissage sont exclus. De plus, lors de la transfection des cellules COS-7 par l'ADN complémentaire codant pour la forme soluble de la chaîne IL-15R α , une protéine de poids moléculaire de 42 kDa a également été détectée par RIA. Une forme soluble de la chaîne IL-15R α de 42 kDa a aussi été mise en évidence dans différents surnageants de culture de lignées cellulaires humaines exprimant la forme membranaire suggérant que le processus de clivage de la forme membranaire est similaire à celui qui agit au niveau des cellules COS-7 transfectées.

Nous avons ensuite cherché quel type de protéase était impliquée dans la libération de la molécule. Différents inhibiteurs de protéases ont été testés sans effet sur le clivage de la forme membranaire de l'IL-15R α . Seul, le GM6001, inhibiteur non spécifique des MMPs, bloque le relargage induit par une stimulation par PMA. Ce phénomène de coupure protéolytique induite par les MMPs a déjà été décrit pour d'autres récepteurs solubles, notamment pour le sIL-2R α (MMP-2 et MMP-9) (Sheu *et al.* 2001). Cependant, le GM6001 est sans effet sur la libération constitutive du sIL-15R α . Ainsi, deux mécanismes différents de clivage protéolytique se trouvent impliqués dans la génération du sIL-15R α ,

ce qui a déjà été montré pour d'autres récepteurs (Hooper *et al.* 1997). Chez la souris, le clivage protéolytique de l'IL-15R α membranaire est dépendant de la TACE (Budagian *et al.* 2004) comme pour de nombreux autres récepteurs de cytokines. Cependant, la plupart des protéases impliquées dans le processus de protéolyse ne sont pas identifiées. En effet, pour un récepteur membranaire, différentes protéases peuvent être impliquées dans le relargage, et inversement, une protéase peut couper différents substrats.

Le poids moléculaire du sIL-15R α de 42 kDa indique que la coupure par la protéase se fait au niveau d'un site à proximité de la membrane, comme il l'a déjà été démontré pour d'autres récepteurs de cytokines (Fernandez-Botran *et al.* 1996). Différentes délétions des domaines 3, 4 ou 5 extracellulaires de l'IL-15R α ont été réalisées mais aucun ne supprime le relargage de la chaîne membranaire. Une première hypothèse est que la (ou les) protéase(s) agit à différents sites de clivage. Une autre hypothèse serait que le (ou les) site(s) de coupure serait localisé(s) dans la partie N-terminale du domaine 6, transmembranaire, mais néanmoins accessible à l'enzyme.

Affinités du sIL-15R α et du sIL-15R α -sushi.

Le sIL-15R α lie l'IL-15 avec une forte affinité ($K_d = 166$ pM), équivalent à l'affinité retrouvée pour la chaîne IL-15R α membranaire isolée ou associée aux deux chaînes réceptrices transductrices IL-2R β et γ_c . Le sIL-15R α , comme le sIL-4R α et le sTNF-R α qui lient leur ligand avec une forte affinité comparable à leur analogue membranaire, est un puissant antagoniste de l'action de l'IL-15. Le sIL-15R α entre en compétition avec la chaîne IL-15R α membranaire et est capable d'inhiber à faibles concentrations ($IC_{50} = 20$ pM) la fixation de l'IL-15 sur l'IL-15R α présent à la surface des cellules. De plus le sIL-15R α inhibe fortement et spécifiquement la prolifération des cellules dépendantes de l'IL-15 ($IC_{50} = 3-10$ pM) mais est sans effet sur la prolifération dépendant de l'IL-2. Les valeurs d' IC_{50} d'inhibition de fixation de l'IL-15 et de prolifération sont du même ordre. En ce qui concerne le sIL-4R α , une concentration 10 fois supérieure en récepteur soluble est nécessaire pour inhiber la prolifération cellulaire dépendante de l'IL-4 par rapport à la concentration efficace pour bloquer la fixation sur le récepteur membranaire (Fernandez-Botran and Vitetta 1990). Ce phénomène s'explique par le fait que le sIL-4R α joue un rôle de transporteur de l'IL-4 (Fernandez-Botran and Vitetta 1991). Le sIL-15R α est aussi, voire plus efficace pour inhiber la prolifération que la

fixation, donc l'IL-15 ne semble pas avoir un tel rôle. Il reste à étudier le rôle protecteur potentiel de l'IL-15 par le sIL-15R α .

La délétion de l'exon 2 codant pour le domaine sushi de la chaîne IL-15R α humaine abroge totalement la fixation de l'IL-15 (Dubois *et al.* 1999). Nous avons, au contraire, observé que la délétion des domaines 3 à 7 résulte en une diminution d'affinité de 10 fois en BiAcore et de 3,5 fois en inhibition de fixation de l'IL-15 sur la chaîne IL-15R α membranaire. En terme de thermodynamique, la diminution de 10 fois de l'affinité correspond à une perte de 10% de l'énergie libre d'interaction entre l'IL-15 et l'IL-15R α . Ainsi, le domaine sushi est responsable de 90% mais pas de la totalité de la liaison. Des résultats préliminaires montrent que le domaine 3 contribue également à la liaison de l'IL-15 sur son récepteur. On observe également que le domaine sushi produit en *E. Coli* présente une affinité 3 à 4 fois inférieure au domaine sushi (sIL-15R α -sushi-IL-2) produit en cellules CHO. Cette différence pourrait s'expliquer en partie par des repliements de la molécule quelque peu différents entre les deux protéines.

Effet agoniste du sIL-15R α

Bien que rentrant en compétition avec l'IL-15 pour la fixation sur la chaîne IL-15R α membranaire, le sIL-15R α -sushi exerce un effet agoniste en amplifiant l'action de l'IL-15 sur le complexe IL-2R β/γ . Les études sur les cellules présentant exclusivement le récepteur d'affinité intermédiaire IL-2R β/γ (MO-7 et 32D β) et les cellules exprimant le récepteur de haute affinité IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ (TF-1 β et Kit 225) montre que l'effet agoniste du sIL-15R α -sushi est spécifique du complexe IL-2R β/γ . Il n'a pas d'effet en absence d'IL-15. De plus, il se fixe aux cellules TF-1 β en présence d'IL-15 avec une seule affinité de liaison et une densité de sites comparable à celle trouvée pour les sites intermédiaires. Sur les MO-7 et TF-1 β , le sIL-15R α -sushi augmente l'affinité de l'IL-15 pour le complexe IL-2R β/γ_c alors qu'il n'affecte pas la fixation de l'IL-15 sur son récepteur de haute affinité IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ présent à la surface des TF-1 β . Le sIL-15R α -sushi augmente l'efficacité de l'action biologique de l'IL-15 (prolifération et protection contre l'apoptose) passant par le récepteur IL-2R β/γ des MO-7, mais est sans effet sur l'action de l'IL-15 à travers le récepteur de haute affinité des TF-1 β .

Les résultats indiquent que le sIL-15R α -sushi et l'IL-15 forment un complexe qui accroît l'affinité de liaison de l'IL-15 pour son récepteur IL-2R β/γ . Au contraire, le sIL-

IL-15R α -sushi n'affecte pas la fixation de l'IL-15 sur le récepteur IL-15R α / β/γ et est sans effet sur l'action biologique. La possibilité que le sIL-15R α -sushi puisse lier l'IL-15 lorsqu'elle est déjà engagée dans un complexe récepteur de haute affinité ne peut cependant être exclue et doit être testée dans des cellules qui exprimeraient un niveau équivalent de chaque chaîne réceptrice et donc presque exclusivement des récepteurs trimériques.

Lors de la première étude, nous avons montré que le sIL-15R α , produit par les cellules exprimant la chaîne membranaire IL-15R α , possède une forte activité antagoniste en inhibant la fixation de l'IL-15 et la prolifération des Kit 225 (Mortier *et al.* 2004). Ces résultats contrastent avec les résultats obtenus avec le sIL-15R α -sushi qui est sans effet sur la prolifération des Kit 225 et des TF-1 β , mais au contraire est agoniste pour les MO-7. De plus, une étude récente montre que l'IL-15 complexé à un récepteur soluble sIL-15R α -Fc (dépourvu du domaine 3) recombinant homodimérique peut induire un effet anti-apoptotique, alors que l'IL-15 seul à la même concentration est sans effet (Giron-Michel *et al.* 2005). Dans un contexte de réponse de haute affinité à l'IL-15, le sIL-15R α agit comme un compétiteur de l'IL-15R α membranaire pour la liaison avec l'IL-15. Au contraire, le complexe formé de l'IL-15 et du sIL-15R α -sushi est capable de s'associer avec le complexe membranaire IL-2R β/γ et d'amplifier les effets biologiques de l'IL-15. Afin d'expliquer l'absence d'effet inhibiteur du sIL-15R α -sushi dans le contexte IL-15R α / β/γ de haute affinité, deux hypothèses se présentent : (i) Le sIL-15R α -sushi a une plus faible affinité pour l'IL-15 ($K_d = 1,5$ nM) que le sIL-15R α , et donc n'est pas capable d'entrer en compétition de façon efficace avec la chaîne IL-15R α à la surface des Kit 225 ou des TF-1 β . (ii) Le sIL-15R α -sushi peut entrer en compétition avec l'IL-15R α membranaire, lier l'IL-15 et former des complexes avec les chaînes IL-2R β et γ_c , comme pour les MO-7. De tels complexes sont moins efficaces et ont besoin de concentration en IL-15 supérieures pour être activés ($IC_{50} = 750$ pM au lieu de 20 pM pour les récepteurs de haute affinité). Si on considère que les chaînes IL-2R β/γ sont en excès par rapport à l'IL-15R α dans les Kit 225 ou les TF-1 β , l'efficacité plus faible de tels complexes peut être compensée par leur plus haute densité (3000 sites d'affinité intermédiaire contre 100 sites de haute affinité sur les TF-1 β). Cela pourrait expliquer l'absence d'effet visible en terme d'activité biologique. Cependant les observations montrant que le sIL-15R α -sushi n'affecte pas la haute affinité de liaison sur les TF-1 β , sont en faveur de la première hypothèse. Les différences fonctionnelles entre le sIL-15R α et le sIL-15R α -sushi

indiquent que la partie C-terminale (domaines 3-5) du sIL-15R α joue un rôle prépondérant dans la compétition avec l'IL-15R α membranaire et renforce l'effet antagoniste du sIL-15R α . Cette extrémité pourrait gêner l'association entre le sIL-15R α avec le complexe IL-2R β/γ , ou encore permettre l'association mais engendrer une conformation inadéquate pour le fonctionnement de l'IL-2R β/γ . Un tel mécanisme a été déjà mis en évidence dans le cas de la forme soluble de la chaîne γ (Meissner *et al.* 2001). L'activité inhibitrice la chaîne γ soluble (qui correspond à la totalité de la partie extracellulaire de la forme membranaire) est abolie en délétant l'extrémité C-terminale ou en mutant le motif WSXWS, deux régions non impliquées dans la liaison avec la cytokine.

sIL-15R α -sushi et Transsignalisation.

Les effets agonistes du sIL-15R α -sushi sont semblables aux effets agonistes décrits pour les récepteurs solubles de la famille de l'IL-6/IL-12 (sIL-6R, sIL-11R, sCNTFR, IL-12p40, EBI-3) (Jones and Rose-John 2002). Un tel effet agoniste du sIL-15R α -sushi n'a jamais été décrit pour les récepteurs solubles de la famille de l'IL-2 (sIL-2R α , sIL-2R β , sIL-4R), d'autant que le sIL-15R α , lui-même, agit en tant qu'antagoniste (Heaney and Golde 1998; Mortier *et al.* 2004). Il serait intéressant d'évaluer si un tel effet agoniste pourrait être obtenu avec une protéine sIL-2R α -sushi.

Le concept de *transsignalisation* a été décrit dans le système IL-6, où le sIL-6R augmente la sensibilité des cellules répondant à l'IL-6 et rend les cellules n'exprimant que la chaîne réceptrice gp130, sans la chaîne IL-6R, capables de répondre à l'IL-6 (Rose-John and Heinrich 1994). Ce concept a été étendu aux autres membres de la famille de l'IL-6 (IL-11R, CNTFR, CLC) (Davis *et al.* 1993; Pflanz *et al.* 1999; Elson *et al.* 2000). Dans le cas de l'IL-15, un mécanisme de *transprésentation* a été décrit dans lequel l'IL-15, produite par les monocytes et les cellules dendritiques, est associée sur ces mêmes cellules à l'IL-15R α membranaire et ainsi, peut stimuler la prolifération des cellules voisines exprimant à leur surface l'IL-2R β/γ (Dubois *et al.* 2002). Des travaux récents suggèrent que la *transprésentation* est le mécanisme principal utilisé *in vivo*, et nécessite que l'IL-15 et l'IL-15R α soient exprimés par les mêmes cellules (Burkett *et al.* 2003; Koka *et al.* 2003; Sandau *et al.* 2004; Schluns *et al.* 2004). On retrouve quelques similarités avec la *transsignalisation*, car le complexe IL-15/sIL-15R α *transprésenté* peut sensibiliser les cellules exprimant les chaînes IL-2R β et γ à des concentrations physiologiques d'IL-15.

Dans ce contexte, l'IL-15R α agit comme agoniste de l'action de l'IL-15 en augmentant son avidité pour le complexe IL-2R β/γ et l'efficacité du signal (Dubois *et al.* 2002). Nos résultats montrent que le sIL-15R α -sushi agit de façon similaire et sensibilise les cellules IL-2R β/γ à l'action de l'IL-15. Cela suggère que le domaine sushi de l'IL-15R α membranaire est indispensable à la *transprésentation*. Nous avons montré que le sIL-15R α produit par les cellules exprimant la forme membranaire et composé de la partie extracellulaire dans sa totalité, est inhibiteur de l'action de l'IL-15. De ce fait, il participe à un mécanisme de contrôle négatif qui limite les effets biologiques de l'IL-15. Au contraire, le sIL-15R α -sushi joue un rôle agoniste. Si de telles formes de sIL-15R α -sushi sont générées par les cellules exprimant l'IL-15R α , elles pourraient contribuer au mécanisme de *transprésentation*. Cependant l'existence de formes solubles du domaine sushi de l'IL-15R α n'a pas encore été mise en évidence, mais peut être supposée par le fait que (i) différentes isoformes de l'IL-15R α membranaire ont été décrites, notamment celle qui lie le domaine sushi directement à la partie transmembranaire (dépourvue des domaines 3, 4 et 5) (Anderson *et al.* 1995; Dubois *et al.* 1999; Bulanova *et al.* 2003). De plus, les différentes isoformes exprimées à la membrane (IL-15R $\alpha\Delta$ 3, IL-15R $\alpha\Delta$ 4 et IL-15R $\alpha\Delta$ 5) subissent toutes une coupure protéolytique libérant dans le surnageant de culture les formes solubles correspondantes (Mortier *et al.* 2004). Du fait que le sIL-15R α et le sIL-15R α -sushi aient des effets régulateurs opposés, ils peuvent ensemble participer de manière concertée à la modulation de l'amplitude et de la durée de l'action biologique de l'IL-15.

Protéine de fusion IL-15/sIL-15R α -sushi.

Une protéine de fusion (Hyper-IL-6) composée du sIL-6R fusionné par son extrémité C-terminale par un lien flexible à l'extrémité N-terminale de l'IL-6, représente une nouvelle forme d'approche pour rendre sensible le complexe IL-6/sIL-6R plus stable et plus actif que la combinaison des molécules d'IL-6 et de sIL-6R (Fischer *et al.* 1997). Une approche similaire a été adoptée dans le cas de l'IL-11 (Pflanz *et al.* 1999). Nous montrons que cette approche est également valable pour l'IL-15. Ainsi, des protéines de fusion ont été générées reliant par un lien flexible l'IL-15 par son extrémité C-terminale à l'extrémité N-terminale du domaine sushi (ILR) et vice-versa (RLI). Les modèles moléculaires de ces protéines de fusion indiquent que le linker ne masque pas les zones impliquées dans la fixation des chaînes IL-2R β et γ_c . Les deux protéines de fusion sont plus efficaces que l'IL-

15 et même que la combinaison de l'IL-15 avec le sIL-15R α -sushi dans l'activation des MO-7. Dans les TF-1 β , donc dans un contexte de récepteur de haute affinité, la protéine de fusion est aussi active que l'IL-15. Cependant la protéine de fusion RLI est 10 fois plus efficace dans l'induction de la prolifération de ces cellules et dans l'inhibition de l'apoptose. Du fait de leur forte activité, ces protéines de fusion hyper-IL-15 sont de puissants outils pour l'expansion de certaines populations de lymphocytes (CD8 mémoires et cellules NK) pour lesquelles la *transpräsentation* est décrite comme le principal processus d'activation physiologique (Burkett *et al.* 2003). Elles peuvent également constituer d'efficaces molécules adjuvantes dans des stratégies thérapeutiques pour des patients atteints de cancers, d'immunodéficiences ou encore de maladies inflammatoires.

La fonctionnalité de cet effet agoniste est supporté par le fait que le sIL-15R α -sushi, une fois lié à l'IL-15 et fixé sur les chaînes IL-2R β et γ des MO-7 est internalisé par ces cellules. Cette particularité est renforcée par l'utilisation des protéines de fusion RLI et ILR. RLI se fixe sur les chaînes IL-2R β / γ avec une affinité 20 fois supérieure que l'IL-15 isolée. La fixation du RLI sur les cellules est rapidement suivie d'une internalisation de la protéine de fusion. De plus, les protéines de fusion sont également plus efficaces dans les tests fonctionnels. Les courbes de dose-réponse des protéines de fusion sur les MO-7 sont comparables à celles de l'IL-15 sur les TF-1 β et les Kit 225, montrant que ces protéines de fusion reconstituent une réponse de haute affinité pour les cellules n'exprimant que le récepteur d'affinité intermédiaire.

sIL-15R α et Maladie de Crohn.

Lors de notre étude préliminaire sur la maladie de Crohn, nous avons d'abord observé que les patients en phase aiguë ont des taux d'IL-15, libre et/ou complexé au sIL-15R α , plus élevé que chez les sujets "normaux". La deuxième observation significative est qu'au cours du traitement Rémicade[®], il y a une diminution de ce taux d'IL-15, libre ou complexé, accompagné d'une augmentation du niveau de sIL-15R α . Deux hypothèses sont envisageables : le traitement Rémicade[®] provoque soit (i) une élimination de l'IL-15 qui, si elle est complexée avec le sIL-15R α , libère le récepteur soluble sous forme libre, soit (ii) une augmentation de la production de sIL-15R α . Au bout de 6 semaines de traitement, on ne détecte plus que le sIL-15R α libre, ce qui suggère que les complexes ont été éliminés de la circulation. Il reste maintenant à tester la présence du complexe dans les

serums de ces patients. Deux études vont dans le sens de nos observations. La première montre une diminution du nombre de cellules exprimant l'IL-15 au cours du traitement de la maladie (Kirman and Nielsen 1996). La seconde étude montre une évolution du taux d'IL-15 dans les biopsies en fonction de la gravité de la maladie. Ainsi, des taux plus élevés d'IL-15 sont retrouvés chez les patients souffrant d'une MC sévère. Au contraire, les patients atteints de la MC dans sa période quiescente présentent des taux d'IL-15 comparables à ceux retrouvés chez les témoins (Silva *et al.* 2003).

Le traitement Rémicade[®] par Ac anti-TNF α bloque l'action du TNF α . Dans la première partie de la thèse, nous avons montré que le TNF α est un facteur qui augmente le clivage de l'IL-15R α *in vitro*, libérant ainsi le sIL-15R α dans le milieu environnant. De plus, le TNF α active la production d'IL-15. Les deux actions du TNF α favorisent la formation d'un complexe IL-15/sIL-15R α . Ainsi, il semblerait que l'IL-15 au cours de la phase aiguë de la MC soit en partie complexée au récepteur soluble. Lors du traitement par Rémicade[®], l'inhibition du TNF α , pourrait donc entraîner une diminution du niveau d'IL-15 libérant ainsi le sIL-15R α . Une étude plus approfondie est nécessaire afin de confirmer cette hypothèse.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence, *in vitro* puis *in vivo*, l'existence d'une forme soluble de la chaîne IL-15R α , et est antagoniste de l'action de l'IL-15. Le sIL-15R α est issu d'une coupure protéolytique de la forme membranaire à proximité de la membrane, il reste cependant à déterminer les acides aminés localisés dans la ou les zone(s) de coupure. La protéase TACE est responsable du relargage de plusieurs molécules membranaires dont l'IL-15R α chez la souris. Il serait intéressant d'identifier la ou les protéases impliquée(s) dans la coupure de la chaîne IL-15R α . Le sIL-15R α présente une affinité de liaison à l'IL-15 comparable à celle de la chaîne membranaire et est capable d'inhiber l'action de l'IL-15 à de faibles concentrations. Basé sur leurs propriétés neutralisantes, certains récepteurs solubles recombinants ont été testés dans des essais cliniques, comme le récepteur soluble du TNF α dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Des études précliniques chez la souris ont déjà montré l'intérêt du sIL-15R α recombinant, ainsi le sIL-15R α est un candidat potentiel pour des applications thérapeutiques.

L'étude de la forme soluble du sushi (sIL-15R α -sushi) montre un effet agoniste sur les cellules présentant les chaînes transductrices IL-2R β et γ_c . Au contraire du sIL-15R α , le sIL-15R α -sushi n'a pas d'effet sur les cellules exprimant le récepteur trimérique de haute affinité. La "tige" (domaines 3-5) jouerait donc un rôle déterminant dans l'action antagoniste du sIL-15R α qui reste à être précisé, notamment au niveau conformationnel. D'autre part, il serait intéressant de rechercher l'existence d'une forme soluble naturelle du domaine sushi de l'IL-15R α . Lors de cette étude, nous avons renforcé l'effet agoniste en stabilisant l'interaction entre l'IL-15 et le sIL-15R α -sushi par un linker, pour former une hyper-IL-15. Du fait de leur forte activité, ces protéines de fusion hyper-IL-15 sont de puissants outils pour l'expansion sélective de certaines populations de lymphocytes. Elles peuvent également constituer d'efficaces molécules adjuvantes dans des stratégies thérapeutiques.

Notre étude préliminaire de dosage de l'IL-15 et du sIL-15R α chez les patients atteints de MC en comparaison avec les témoins "sains" montre l'existence du sIL-15R α dans le sérum. De plus, les premiers résultats montrent une corrélation entre les taux d'IL-15 et de sIL-15R α et le traitement des patients par les Ac anti-TNF α (Rémicade®). Le

dosage du complexe dans les sérums de ces patients sera nécessaire afin de mieux comprendre l'action du sIL-15R α au cours de la maladie. De plus, il reste à d'étendre les recherches sur un nombre plus élevé de patients atteints de MC mais également de RCH, et à approfondir l'étude sur des biopsies, afin d'observer localement l'influence du sIL-15R α . L'étude du sIL-15R α pourrait ainsi aider à éclaircir l'implication de l'IL-15 au cours du processus inflammatoire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aderka, D. (1996). "The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors." Cytokine Growth Factor Rev **7**(3): 231-40.
2. Aderka, D., H. Engelmann, Y. Maor, C. Brakebusch and D. Wallach (1992). "Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors." J Exp Med **175**(2): 323-9.
3. Adorini, L. (1999). "Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases." Cell Mol Life Sci **55**(12): 1610-25.
4. Agostini, C., L. Trentin, M. Facco, R. Sancetta, A. Cerutti, C. Tassinari, L. Cimarosto, F. Adami, A. Cipriani, R. Zambello and G. Semenzato (1996). "Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis." J Immunol **157**(2): 910-8.
5. Agostini, C., L. Trentin, A. Perin, M. Facco, M. Siviero, F. Piazza, U. Basso, F. Adami, R. Zambello and G. Semenzato (1999). "Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): L240-50.
6. Ahmed, N. N., H. L. Grimes, A. Bellacosa, T. O. Chan and P. N. Tsichlis (1997). "Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3627-32.
7. Ajjan, R. A., P. F. Watson and A. P. Weetman (1997). "Detection of IL-12, IL-13, and IL-15 messenger ribonucleic acid in the thyroid of patients with autoimmune thyroid disease." J Clin Endocrinol Metab **82**(2): 666-9.
8. Akira, S., T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto (1990). "Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)." Faseb J **4**(11): 2860-7.
9. Allavena, P., G. Giardina, G. Bianchi and A. Mantovani (1997). "IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium." J Leukoc Biol **61**(6): 729-35.
10. Alleva, D. G., S. B. Kaser, M. A. Monroy, M. J. Fenton and D. I. Beller (1997). "IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition." J Immunol **159**(6): 2941-51.
11. Alpdogan, O., J. M. Eng, S. J. Muriglan, L. M. Willis, V. M. Hubbard, K. H. Tjoe, T. H. Terwey, A. Kochman and M. R. van den Brink (2005). "Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **105**(2): 865-73.
12. Alpdogan, O. and M. R. van den Brink (2005). "IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency." Trends Immunol **26**(1): 56-64.
13. Ambrosetti, A., G. Nadali, F. Vinante, S. Carlini, D. Veneri, G. Todeschini, L. Morosato, D. de Sabata, M. Chilosi, E. Maggi and et al. (1993). "Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in Hodgkin disease. Relationship with clinical stage, tumor burden, and treatment outcome." Cancer **72**(1): 201-6.
14. Ameglio, F., L. D'Auria, P. Cordiali-Fei, E. Trento, G. D'Agosto, A. Mastroianni, A. Giannetti and B. Giacalone (1999). "Anti-intercellular substance antibody log titres are correlated with serum concentrations of interleukin-6, interleukin-15 and tumor necrosis factor-alpha in patients with Pemphigus vulgaris relationships with peripheral blood neutrophil counts, disease severity and duration and patients' age." J Biol Regul Homeost Agents **13**(4): 220-4.
15. Amicosante, M., F. Poccia, C. Gioia, C. Montesano, S. Topino, F. Martini, P. Narciso, L. P. Pucillo and G. D'Offizi (2003). "Levels of interleukin-15 in plasma may predict a favorable outcome of structured treatment interruption in patients with chronic human immunodeficiency virus infection." J Infect Dis **188**(5): 661-5.
16. Anderson, D. M., L. Johnson, M. B. Glaccum, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, V. Valentine, M. N. Kirstein, D. N. Shapiro, S. W. Morris and et al. (1995). "Chromosomal assignment and genomic structure of Il15." Genomics **25**(3): 701-6.

17. Anderson, D. M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and et al. (1995). "Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes." J Biol Chem **270**(50): 29862-9.
18. Andreola, G., L. Rivoltini, C. Castelli, V. Huber, P. Perego, P. Deho, P. Squarcina, P. Accornero, F. Lozupone, L. Lugini, A. Stringaro, A. Molinari, G. Arancia, M. Gentile, G. Parmiani and S. Fais (2002). "Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles." J Exp Med **195**(10): 1303-16.
19. Angiolillo, A. L., H. Kanegane, C. Sgadari, G. H. Reaman and G. Tosato (1997). "Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo." Biochem Biophys Res Commun **233**(1): 231-7.
20. Arend, W. P. (1995). "Inhibiting the effects of cytokines in human diseases." Adv Intern Med **40**: 365-94.
21. Armitage, R. J., B. M. Macduff, J. Eisenman, R. Paxton and K. H. Grabstein (1995). "IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation." J Immunol **154**(2): 483-90.
22. Auernhammer, C. J. and S. Melmed (2000). "Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function." Endocr Rev **21**(3): 313-45.
23. Avice, M. N., C. E. Demeure, G. Delespesse, M. Rubio, M. Armant and M. Sarfati (1998). "IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN-gamma secretion by CD4+ T cells in the absence of TCR ligation." J Immunol **161**(7): 3408-15.
24. Azimi, N., K. Brown, R. N. Bamford, Y. Tagaya, U. Siebenlist and T. A. Waldmann (1998). "Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2452-7.
25. Azimi, N., S. Jacobson, T. Leist and T. A. Waldmann (1999). "Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor." J Immunol **163**(7): 4064-72.
26. Azimi, N., J. Mariner, S. Jacobson and T. A. Waldmann (2000). "How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis?" AIDS Res Hum Retroviruses **16**(16): 1717-22.
27. Azimi, N., M. Nagai, S. Jacobson and T. A. Waldmann (2001). "IL-15 plays a major role in the persistence of Tax-specific CD8 cells in HAM/TSP patients." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14559-64.
28. Baan, C. C., C. J. Knoop, T. van Gelder, C. T. Holweg, H. G. Niesters, T. J. Smeets, F. van der Ham, P. E. Zondervan, L. P. Maat, A. H. Balk and W. Weimar (1999). "Anti-CD25 therapy reveals the redundancy of the intra-graft cytokine network after clinical heart transplantation." Transplantation **67**(6): 870-6.
29. Baan, C. C., H. G. Niesters, H. J. Metselaar, W. M. Mol, E. H. Loonen, P. E. Zondervan, H. W. Tilanus, I. J. JM, S. W. Schalm and W. Weimar (1998). "Increased intra-graft IL-15 mRNA expression after liver transplantation." Clin Transplant **12**(3): 212-8.
30. Baan, C. C., T. van Gelder, A. H. Balk, C. J. Knoop, C. T. Holweg, L. P. Maat and W. Weimar (2000). "Functional responses of T cells blocked by anti-CD25 antibody therapy during cardiac rejection." Transplantation **69**(3): 331-6.
31. Baan, C. C., I. C. van Riemsdijk-Overbeeke, M. J. Boelaars-van Haperen, I. J. JM and W. Weimar (2002). "Inhibition of the IL-15 pathway in anti-CD25 mAb treated renal allograft recipients." Transpl Immunol **10**(1): 81-7.
32. Bacchetta, R., C. Sartirana, M. K. Levings, C. Bordinon, S. Narula and M. G. Roncarolo (2002). "Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines." Eur J Immunol **32**(8): 2237-45.
33. Badolato, R., A. N. Ponzi, M. Millesimo, L. D. Notarangelo and T. Musso (1997). "Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes." Blood **90**(7): 2804-9.

34. Balasubramanian, S., T. Chernov-Rogan, A. M. Davis, E. Whitehorn, E. Tate, M. P. Bell, G. Zurawski and R. W. Barrett (1995). "Ligand binding kinetics of IL-2 and IL-15 to heteromers formed by extracellular domains of the three IL-2 receptor subunits." Int Immunol **7**(11): 1839-49.
35. Bamford, R. N., A. P. Battista, J. D. Burton, H. Sharma and T. A. Waldmann (1996). "Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2897-902.
36. Bamford, R. N., A. P. DeFilippis, N. Azimi, G. Kurys and T. A. Waldmann (1998). "The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control." J Immunol **160**(9): 4418-26.
37. Bamford, R. N., A. J. Grant, J. D. Burton, C. Peters, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler and T. A. Waldmann (1994). "The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4940-4.
38. Bani, L., D. David, J. L. Moreau, A. Cayota, T. Nakarai, J. Ritz and J. Theze (1997). "Expression of the IL-2 receptor gamma subunit in resting human CD4 T lymphocytes: mRNA is constitutively transcribed and the protein stored as an intracellular component." Int Immunol **9**(4): 573-80.
39. Bank, U., B. Kupper and S. Ansorge (2000). "Inactivation of interleukin-6 by neutrophil proteases at sites of inflammation. Protective effects of soluble IL-6 receptor chains." Adv Exp Med Biol **477**: 431-7.
40. Baran, D., M. Korner and J. Theze (1988). "Characterization of the soluble murine IL-2R and estimation of its affinity for IL-2." J Immunol **141**(2): 539-46.
41. Bargetzi, M. J., M. Lantz, C. G. Smith, F. M. Torti, I. Olsson, S. P. Eisenberg and H. F. Starnes, Jr. (1993). "Interleukin-1 beta induces interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein in humans." Cancer Res **53**(17): 4010-3.
42. Barral-Netto, M., A. Barral, S. B. Santos, E. M. Carvalho, R. Badaro, H. Rocha, S. G. Reed and W. D. Johnson, Jr. (1991). "Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis." J Immunol **147**(1): 281-4.
43. Barzegar, C., R. Meazza, R. Pereno, C. Pottin-Clemenceau, M. Scudeletti, D. Brouty-Boye, C. Doucet, Y. Taoufik, J. Ritz, C. Musselli, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini and B. Azzarone (1998). "IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops." Oncogene **16**(19): 2503-12.
44. Baumann, H., Y. Wang, K. K. Morella, C. F. Lai, H. Dams, D. J. Hilton, R. G. Hawley and A. Mackiewicz (1996). "Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells." J Immunol **157**(1): 284-90.
45. Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 6934-8.
46. Belladonna, M. L., J. C. Renauld, R. Bianchi, C. Vacca, F. Fallarino, C. Orabona, M. C. Fioretti, U. Grohmann and P. Puccetti (2002). "IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells." J Immunol **168**(11): 5448-54.
47. Bemelmans, M. H., D. Abramowicz, D. J. Gouma, M. Goldman and W. A. Buurman (1994). "In vivo T cell activation by anti-CD3 monoclonal antibody induces soluble TNF receptor release in mice. Effects of pentoxifylline, methylprednisolone, anti-TNF, and anti-IFN-gamma antibodies." J Immunol **153**(2): 499-506.
48. Bernard, J., C. Harb, E. Mortier, A. Quemener, R. H. Meloen, C. Vermot-Desroches, J. Wijdeness, P. van Dijken, J. Grotzinger, J. W. Slootstra, A. Plet and Y. Jacques (2004). "Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15." J Biol Chem **279**(23): 24313-22.

49. Bismuth, G., L. Leclercq, M. Duphot, J. L. Moreau and J. Theze (1984). "In vitro induction and expression of interleukin 2 receptor in a clonal T helper cell differentiation model." Cell Immunol **86**(1): 90-100.
50. Bitard, J., S. Daburon, L. Duplomb, F. Blanchard, P. Vuisio, Y. Jacques, A. Godard, J. K. Heath, J. F. Moreau and J. L. Taupin (2003). "Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF." J Biol Chem **278**(18): 16253-61.
51. Black, R. A. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." Int J Biochem Cell Biol **34**(1): 1-5.
52. Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-33.
53. Bluman, E. M., K. J. Bartynski, B. R. Avalos and M. A. Caligiuri (1996). "Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines." J Clin Invest **97**(12): 2722-7.
54. Bock, G. H., L. Neu, C. Long, L. T. Patterson, S. Korb, J. Gelpi and D. L. Nelson (1994). "An assessment of serum and urine soluble interleukin-2 receptor concentrations during renal transplant rejection." Am J Kidney Dis **23**(3): 421-6.
55. Borbolla, J. R., M. A. Lopez-Hernandez, J. De Diego, M. Gonzalez-Avante, E. Trueba and M. T. Collados (2001). "Use of interleukin-11 after autologous stem cell transplant: report of three cases and a very brief review of the literature." Haematologica **86**(8): 891-2.
56. Borger, P., H. F. Kauffman, D. S. Postma, M. T. Esselink and E. Vellenga (1999). "Interleukin-15 differentially enhances the expression of interferon-gamma and interleukin-4 in activated human (CD4+) T lymphocytes." Immunology **96**(2): 207-14.
57. Bosco, M. C., I. Espinoza-Delgado, M. Schwabe, S. M. Russell, W. J. Leonard, D. L. Longo and L. Varesio (1994). "The gamma subunit of the interleukin-2 receptor is expressed in human monocytes and modulated by interleukin-2, interferon gamma, and transforming growth factor beta 1." Blood **83**(12): 3462-7.
58. Briard, D., D. Brouty-Boye, B. Azzarone and C. Jasmin (2002). "Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15." J Immunol **168**(9): 4326-32.
59. Brown, A. E., K. T. Rieder and H. K. Webster (1989). "Prolonged elevations of soluble interleukin-2 receptors in tuberculosis." Am Rev Respir Dis **139**(4): 1036-8.
60. Budagian, V., E. Bulanova, Z. Orinska, A. Ludwig, S. Rose-John, P. Saftig, E. C. Borden and S. Bulfone-Paus (2004). "Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)." J Biol Chem **279**(39): 40368-75.
61. Budagian, V., E. Bulanova, Z. Orinska, T. Pohl, E. C. Borden, R. Silverman and S. Bulfone-Paus (2004). "Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15." J Biol Chem **279**(40): 42192-201.
62. Bulanova, E., V. Budagian, Z. Orinska, H. Krause, R. Paus and S. Bulfone-Paus (2003). "Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms." J Immunol **170**(10): 5045-55.
63. Bulanova, E., V. Budagian, T. Pohl, H. Krause, H. Durkop, R. Paus and S. Bulfone-Paus (2001). "The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells." J Immunol **167**(11): 6292-302.
64. Bulfone-Pau, S. S., E. Bulanova, T. Pohl, V. Budagian, H. Durkop, R. Ruckert, U. Kunzendorf, R. Paus and H. Krause (1999). "Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain." Faseb J **13**(12): 1575-85.
65. Bulfone-Paus, S., H. Durkop, R. Paus, H. Krause, T. Pohl and A. Onu (1997). "Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15." Cytokine **9**(7): 507-13.

66. Bulfone-Paus, S., D. Ungureanu, T. Pohl, G. Lindner, R. Paus, R. Ruckert, H. Krause and U. Kunzendorf (1997). "Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo." Nat Med **3**(10): 1124-8.
67. Burkett, P. R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, F. Chan, A. Ma and D. L. Boone (2003). "IL-15R alpha expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4724-9.
68. Burton, J. D., R. N. Bamford, C. Peters, A. J. Grant, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler and T. A. Waldmann (1994). "A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4935-9.
69. Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, T. J. Manley, H. Levine, K. A. Smith and J. Ritz (1990). "Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors." J Exp Med **171**(5): 1509-26.
70. Cao, X., E. W. Shores, J. Hu-Li, M. R. Anver, B. L. Kelsall, S. M. Russell, J. Drago, M. Noguchi, A. Grinberg, E. T. Bloom and et al. (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain." Immunity **2**(3): 223-38.
71. Carbo, N., J. Lopez-Soriano, P. Costelli, B. Alvarez, S. Busquets, F. M. Baccino, L. S. Quinn, F. J. Lopez-Soriano and J. M. Argiles (2001). "Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control." Biochim Biophys Acta **1526**(1): 17-24.
72. Carson, W. E., T. A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhert, M. J. Lindemann, C. F. Lai, C. M. Croce, H. Baumann and M. A. Caligiuri (1997). "A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival." J Clin Invest **99**(5): 937-43.
73. Carson, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein and M. A. Caligiuri (1994). "Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor." J Exp Med **180**(4): 1395-403.
74. Carson, W. E., M. E. Ross, R. A. Baiocchi, M. J. Marien, N. Boiani, K. Grabstein and M. A. Caligiuri (1995). "Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro." J Clin Invest **96**(6): 2578-82.
75. Cassatella, M. A. and P. P. McDonald (2000). "Interleukin-15 and its impact on neutrophil function." Curr Opin Hematol **7**(3): 174-7.
76. Castagnoli, C., C. Trombotto, S. Ariotti, M. Millesimo, D. Ravarino, G. Magliacani, A. N. Ponzi, M. Stella, S. Teich-Alasia, F. Novelli and T. Musso (1999). "Expression and role of IL-15 in post-burn hypertrophic scars." J Invest Dermatol **113**(2): 238-45.
77. Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, M. M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J. L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W. S. Dalton and R. Jove (1999). "Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells." Immunity **10**(1): 105-15.
78. Chehimi, J., J. D. Marshall, O. Salvucci, I. Frank, S. Chehimi, S. Kawecki, D. Bacheller, S. Rifat and S. Chouaib (1997). "IL-15 enhances immune functions during HIV infection." J Immunol **158**(12): 5978-87.
79. Chen, Q., N. Ghilardi, H. Wang, T. Baker, M. H. Xie, A. Gurney, I. S. Grewal and F. J. de Sauvage (2000). "Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR." Nature **407**(6806): 916-20.
80. Chilton, P. M. and R. Fernandez-Botran (1993). "Production of soluble IL-4 receptors by murine spleen cells is regulated by T cell activation and IL-4." J Immunol **151**(11): 5907-17.
81. Chitnis, V., R. Pahwa and S. Pahwa (2003). "Determinants of HIV-specific CD8 T-cell responses in HIV-infected pediatric patients and enhancement of HIV-gag-specific responses with exogenous IL-15." Clin Immunol **107**(1): 36-45.

82. Chu, C. L., S. S. Chen, T. S. Wu, S. C. Kuo and N. S. Liao (1999). "Differential effects of IL-2 and IL-15 on the death and survival of activated TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes." J Immunol **162**(4): 1896-903.
83. Chua, A. O., R. Chizzonite, B. B. Desai, T. P. Truitt, P. Nunes, L. J. Minetti, R. R. Warrier, D. H. Presky, J. F. Levine, M. K. Gately and et al. (1994). "Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130." J Immunol **153**(1): 128-36.
84. Chua, A. O., V. L. Wilkinson, D. H. Presky and U. Gubler (1995). "Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component." J Immunol **155**(9): 4286-94.
85. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo and P. Lusso (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
86. Cope, A. P., D. Aderka, D. Wallach, M. Kahan, N. R. Chu, F. M. Brennan and M. Feldmann (1995). "Soluble TNF receptor production by activated T lymphocytes: differential effects of acute and chronic exposure to TNF." Immunology **84**(1): 21-30.
87. Cunnion, K. M. (1999). "Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses." Mol Genet Metab **67**(4): 278-82.
88. d'Ettorre, G., G. Forcina, M. Lichtner, F. Mengoni, C. D'Agostino, A. P. Massetti, C. M. Mastroianni and V. Vullo (2002). "Interleukin-15 in HIV infection: immunological and virological interactions in antiretroviral-naïve and -treated patients." Aids **16**(2): 181-8.
89. Davie, E. W., A. Ichinose and S. P. Leytus (1986). "Structural features of the proteins participating in blood coagulation and fibrinolysis." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 509-14.
90. Davis, S., T. H. Aldrich, N. Y. Ip, N. Stahl, S. Scherer, T. Farruggella, P. S. DiStefano, R. Curtis, N. Panayotatos, H. Gascan and et al. (1993). "Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses." Science **259**(5102): 1736-9.
91. Davis, S., T. H. Aldrich, D. M. Valenzuela, V. V. Wong, M. E. Furth, S. P. Squinto and G. D. Yancopoulos (1991). "The receptor for ciliary neurotrophic factor." Science **253**(5015): 59-63.
92. Dayer, J. M. and D. Burger (1994). "Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors." Eur Cytokine Netw **5**(6): 563-71.
93. de Jong, J. L., N. L. Farner, M. B. Widmer, J. G. Giri and P. M. Sondel (1996). "Interaction of IL-15 with the shared IL-2 receptor beta and gamma c subunits. The IL-15/beta/gamma c receptor-ligand complex is less stable than the IL-2/beta/gamma c receptor-ligand complex." J Immunol **156**(4): 1339-48.
94. Debets, R. and H. F. Savelkoul (1994). "Cytokine antagonists and their potential therapeutic use." Immunol Today **15**(10): 455-8.
95. Demoulin, J. B. and J. C. Renauld (1998). "Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function." Int Rev Immunol **16**(3-4): 345-64.
96. Devergne, O., M. Birkenbach and E. Kieff (1997). "Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12041-6.
97. Di Sabatino, A., R. Ciccocioppo, F. Cupelli, B. Cinque, D. Millimaggi, M. M. Clarkson, M. Paulli, M. G. Cifone and G. R. Corazza (2005). "Epithelium-derived interleukin-15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity and survival in coeliac disease." Gut.
98. Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge and J. Schlessinger (1996). "A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation." Nature **383**(6600): 547-50.

99. Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." Int Rev Immunol **16**(5-6): 457-99.
100. Dobbeling, U., R. Dummer, E. Laine, N. Potoczna, J. Z. Qin and G. Burg (1998). "Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells." Blood **92**(1): 252-8.
101. Doherty, T. M., R. A. Seder and A. Sher (1996). "Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages." J Immunol **156**(2): 735-41.
102. Dong, C. and R. A. Flavell (2001). "Th1 and Th2 cells." Curr Opin Hematol **8**(1): 47-51.
103. Doucet, C., R. Meazza, C. Pottin-Clemenceau, M. Scudeletti, D. Brouty-Boye, S. Ferrini, A. Alileche, Y. Taoufik, C. Jasmin, B. Azzarone and F. Indiveri (1997). "Role of interleukin (IL)-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP, derived from an IL-2 progressor patient." Melanoma Res **7 Suppl 2**: S7-17.
104. Dragic, T., A. Trkola, S. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu, C. R. Mackay, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, J. P. Moore and P. J. Maddon (1998). "Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry." J Virol **72**(1): 279-85.
105. Dubois, S., F. Magrangeas, P. Lehours, S. Raher, J. Bernard, O. Boisteau, S. Leroy, S. Minvielle, A. Godard and Y. Jacques (1999). "Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression." J Biol Chem **274**(38): 26978-84.
106. Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann and Y. Tagaya (2002). "IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells." Immunity **17**(5): 537-47.
107. Dukovich, M., Y. Wano, T. Le thi Bich, P. Katz, B. R. Cullen, J. H. Kehrl and W. C. Greene (1987). "A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors." Nature **327**(6122): 518-22.
108. Dumoutier, L., D. Lejeune, D. Colau and J. C. Renauld (2001). "Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22." J Immunol **166**(12): 7090-5.
109. Ebert, E. C. (1998). "Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes." Gastroenterology **115**(6): 1439-45.
110. Edelbaum, D., M. Mohamadzadeh, P. R. Bergstresser, K. Sugamura and A. Takashima (1995). "Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor." J Invest Dermatol **105**(6): 837-43.
111. Elson, G. C., E. Lelievre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A. B. de Coignac, Y. Delneste, J. Y. Bonnefoy, J. F. Gauchat and H. Gascan (2000). "CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex." Nat Neurosci **3**(9): 867-72.
112. Espinoza-Delgado, I., J. R. Ortaldo, R. Winkler-Pickett, K. Sugamura, L. Varesio and D. L. Longo (1990). "Expression and role of p75 interleukin 2 receptor on human monocytes." J Exp Med **171**(5): 1821-6.
113. Esteve, P. O., E. Chicoine, O. Robledo, F. Aoudjit, A. Descoteaux, E. F. Potworowski and Y. St-Pierre (2002). "Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B." J Biol Chem **277**(38): 35150-5.
114. Fehniger, T. A. and M. A. Caligiuri (2001). "Interleukin 15: biology and relevance to human disease." Blood **97**(1): 14-32.
115. Fehniger, T. A., W. E. Carson and M. A. Caligiuri (1999). "Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production." Transplant Proc **31**(3): 1476-8.
116. Fehniger, T. A., G. Herbein, H. Yu, M. I. Para, Z. P. Bernstein, W. A. O'Brien and M. A. Caligiuri (1998). "Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection." J Immunol **161**(11): 6433-8.

117. Fehniger, T. A., M. H. Shah, M. J. Turner, J. B. VanDeusen, S. P. Whitman, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid and M. A. Caligiuri (1999). "Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response." J Immunol **162**(8): 4511-20.
118. Fehniger, T. A., K. Suzuki, A. Ponnappan, J. B. VanDeusen, M. A. Cooper, S. M. Florea, A. G. Freud, M. L. Robinson, J. Durbin and M. A. Caligiuri (2001). "Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells." J Exp Med **193**(2): 219-31.
119. Fernandez-Botran, R. (1999). "Soluble cytokine receptors: basic immunology and clinical applications." Crit Rev Clin Lab Sci **36**(3): 165-224.
120. Fernandez-Botran, R., P. M. Chilton and Y. Ma (1996). "Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy." Adv Immunol **63**: 269-336.
121. Fernandez-Botran, R., P. M. Chilton, Y. Ma, J. L. Windsor and N. E. Street (1996). "Control of the production of soluble interleukin-4 receptors: implications in immunoregulation." J Leukoc Biol **59**(4): 499-504.
122. Fernandez-Botran, R., F. A. Crespo and X. Sun (2002). "Soluble cytokine receptors in biological therapy." Expert Opin Biol Ther **2**(6): 585-605.
123. Fernandez-Botran, R. and E. S. Vitetta (1990). "A soluble, high-affinity, interleukin-4-binding protein is present in the biological fluids of mice." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4202-6.
124. Fernandez-Botran, R. and E. S. Vitetta (1991). "Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins." J Exp Med **174**(3): 673-81.
125. Fernandez-Botran, R., T. A. Wynn, S. Hieny, P. Caspar, P. M. Chilton and A. Sher (1995). "Linked in vivo expression of soluble interleukin-4 receptor and interleukin-4 in murine schistosomiasis." Eur J Immunol **25**(3): 649-56.
126. Ferrari-Lacraz, S., X. X. Zheng, Y. S. Kim, Y. Li, W. Maslinski, X. C. Li and T. B. Strom (2001). "An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection." J Immunol **167**(6): 3478-85.
127. Ferrari-Lacraz, S., X. X. Zheng, Y. S. Kim, W. Maslinski and T. B. Strom (2002). "Addition of an IL-15 mutant/FCgamma2A antagonist protein protects islet allografts from rejection overriding costimulation blockade." Transplant Proc **34**(3): 745-7.
128. Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones and A. Trifilieff (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." J Immunol **170**(4): 2106-12.
129. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-5.
130. Flamand, L., I. Stefanescu and J. Menezes (1996). "Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15." J Clin Invest **97**(6): 1373-81.
131. Friedmann, M. C., T. S. Migone, S. M. Russell and W. J. Leonard (1996). "Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2077-82.
132. Frieling, J. T., R. W. Sauerwein, J. Wijdenes, T. Hendriks and C. J. van der Linden (1994). "Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin." Cytokine **6**(4): 376-81.
133. Fujii, H., Y. Nakagawa, U. Schindler, A. Kawahara, H. Mori, F. Gouilleux, B. Groner, J. N. Ihle, Y. Minami, T. Miyazaki and et al. (1995). "Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the

- interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5482-6.
134. Gadina, M., D. Hilton, J. A. Johnston, A. Morinobu, A. Lighvani, Y. J. Zhou, R. Visconti and J. J. O'Shea (2001). "Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after." Curr Opin Immunol **13**(3): 363-73.
 135. Gadina, M., C. Sudarshan and J. J. O'Shea (1999). "IL-2, but not IL-4 and other cytokines, induces phosphorylation of a 98-kDa protein associated with SHP-2, phosphatidylinositol 3'-kinase, and Grb2." J Immunol **162**(4): 2081-6.
 136. Gadina, M., C. Sudarshan, R. Visconti, Y. J. Zhou, H. Gu, B. G. Neel and J. J. O'Shea (2000). "The docking molecule gab2 is induced by lymphocyte activation and is involved in signaling by interleukin-2 and interleukin-15 but not other common gamma chain-using cytokines." J Biol Chem **275**(35): 26959-66.
 137. Gaggero, A., B. Azzarone, C. Andrei, Z. Mishal, R. Meazza, E. Zappia, A. Rubartelli and S. Ferrini (1999). "Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms." Eur J Immunol **29**(4): 1265-74.
 138. Gaillard, J. P., R. Bataille, H. Brailly, C. Zuber, K. Yasukawa, M. Attal, N. Maruo, T. Taga, T. Kishimoto and B. Klein (1993). "Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy." Eur J Immunol **23**(4): 820-4.
 139. Gately, M. K., D. M. Carvajal, S. E. Connaughton, S. Gillessen, R. R. Warrier, K. D. Kolinsky, V. L. Wilkinson, C. M. Dwyer, G. F. Higgins, Jr., F. J. Podlaski, D. A. Faherty, P. C. Familletti, A. S. Stern and D. H. Presky (1996). "Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo." Ann N Y Acad Sci **795**: 1-12.
 140. Gately, M. K., B. B. Desai, A. G. Wolitzky, P. M. Quinn, C. M. Dwyer, F. J. Podlaski, P. C. Familletti, F. Sinigaglia, R. Chizzonite, U. Gubler and et al. (1991). "Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)." J Immunol **147**(3): 874-82.
 141. Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon and et al. (1994). "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." Nature **370**(6490): 555-7.
 142. Gearing, A. J. and W. Newman (1993). "Circulating adhesion molecules in disease." Immunol Today **14**(10): 506-12.
 143. Gearing, D. P. and D. Cosman (1991). "Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor." Cell **66**(1): 9-10.
 144. Gessner, A. and M. Rollinghoff (1994). "Soluble IL-4 receptor, potential for therapeutic and prophylactic intervention." Behring Inst Mitt(95): 35-41.
 145. Gessner, A. and M. Rollinghoff (2000). "Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes." Immunobiology **201**(3-4): 285-307.
 146. Gilboa, E. (1999). "How tumors escape immune destruction and what we can do about it." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 382-5.
 147. Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman and D. Anderson (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." Embo J **13**(12): 2822-30.
 148. Giri, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. DuBose, D. Cosman, L. S. Park and D. M. Anderson (1995). "Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor." Embo J **14**(15): 3654-63.
 149. Giron-Michel, J., A. Caignard, M. Fogli, D. Brouty-Boye, D. Briard, M. van Dijk, R. Meazza, S. Ferrini, C. Lebousse-Kerdiles, D. Clay, H. Bompais, S. Chouaib, B. Peault and B. Azzarone (2003). "Differential STAT3,

- STAT5, and NF-kappaB activation in human hematopoietic progenitors by endogenous interleukin-15: implications in the expression of functional molecules." Blood **102**(1): 109-17.
150. Giron-Michel, J., M. Fogli, A. Gaggero, S. Ferrini, A. Caignard, D. Brouty-Boye, S. Baouz, M. C. Le Bousse-Kerdiles, B. Peault, M. van Dijk, S. Bulfone-Paus, D. Durali, S. Chouaib and B. Azzarone (2003). "Detection of a functional hybrid receptor gammac/GM-CSFRbeta in human hematopoietic CD34+ cells." J Exp Med **197**(6): 763-75.
 151. Giron-Michel, J., M. Giuliani, M. Fogli, D. Brouty-Boye, S. Ferrini, F. Baychelier, P. Eid, C. Lebousse Kerdiles, D. Durali, R. Biassoni, B. Charpentier, A. Vasquez, S. Chouaib, A. Caignard, L. Moretta and B. Azzarone (2005). "Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R{alpha} complexes display differential signalling and functions on human haematopoietic progenitors." Blood.
 152. Goldsmith, M. A., S. Y. Lai, W. Xu, M. C. Amaral, E. S. Kuczek, L. J. Parent, G. B. Mills, K. L. Tarr, G. D. Longmore and W. C. Greene (1995). "Growth signal transduction by the human interleukin-2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the beta chain and non-tyrosine residues of the gamma c chain." J Biol Chem **270**(37): 21729-37.
 153. Gomez-Lechon, M. J. (1999). "Oncostatin M: signal transduction and biological activity." Life Sci **65**(20): 2019-30.
 154. Goodwin, R. G., D. Friend, S. F. Ziegler, R. Jerzy, B. A. Falk, S. Gimpel, D. Cosman, S. K. Dower, C. J. March, A. E. Namen and et al. (1990). "Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily." Cell **60**(6): 941-51.
 155. Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh and et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." Science **264**(5161): 965-8.
 156. Greipp, P. R. (1994). "Prognosis in myeloma." Mayo Clin Proc **69**(9): 895-902.
 157. Gri, G., C. Chiodoni, E. Gallo, A. Stoppacciaro, F. Y. Liew and M. P. Colombo (2002). "Antitumor effect of interleukin (IL)-12 in the absence of endogenous IFN-gamma: a role for intrinsic tumor immunogenicity and IL-15." Cancer Res **62**(15): 4390-7.
 158. Grotzinger, J., T. Kernebeck, K. J. Kallen and S. Rose-John (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?" Biol Chem **380**(7-8): 803-13.
 159. Gubler, U., A. O. Chua, D. S. Schoenhaut, C. M. Dwyer, W. McComas, R. Motyka, N. Nabavi, A. G. Wolitzky, P. M. Quinn, P. C. Familletti and et al. (1991). "Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4143-7.
 160. Ha, S. J., C. H. Lee, S. B. Lee, C. M. Kim, K. L. Jang, H. S. Shin and Y. C. Sung (1999). "A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages." J Immunol **163**(5): 2902-8.
 161. Hacker, C., R. D. Kirsch, X. S. Ju, T. Hieronymus, T. C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S. M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota and M. Zenke (2003). "Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development." Nat Immunol **4**(4): 380-6.
 162. Hanisch, U. K., S. A. Lyons, M. Prinz, C. Nolte, J. R. Weber, H. Kettenmann and F. Kirchhoff (1997). "Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity." J Biol Chem **272**(46): 28853-60.
 163. Harada, S., M. Yamamura, H. Okamoto, Y. Morita, M. Kawashima, T. Aita and H. Makino (1999). "Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **42**(7): 1508-16.
 164. Hawari, F. I., F. N. Rouhani, X. Cui, Z. X. Yu, C. Buckley, M. Kaler and S. J. Levine (2004). "Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1297-302.

165. Heaney, M. L. and D. W. Golde (1998). "Soluble receptors in human disease." J Leukoc Biol **64**(2): 135-46.
166. Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper and L. Graeve (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J **334** (Pt 2): 297-314.
167. Hofmeister, R., A. R. Khaled, N. Benbernou, E. Rajnavolgyi, K. Muegge and S. K. Durum (1999). "Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 41-60.
168. Honda, M., K. Kitamura, K. Matsuda, Y. Yokota, N. Yamamoto, R. Mitsuyasu, J. C. Chermann and T. Tokunaga (1989). "Soluble IL-2 receptor in AIDS. Correlation of its serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization." J Immunol **142**(12): 4248-55.
169. Honda, M., K. Kitamura, T. Takeshita, K. Sugamura and T. Tokunaga (1990). "Identification of a soluble IL-2 receptor beta-chain from human lymphoid cell line cells." J Immunol **145**(12): 4131-5.
170. Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga and T. Kishimoto (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." J Immunol **148**(7): 2175-80.
171. Hoontrakoon, R., H. W. Chu, S. J. Gardai, S. E. Wenzel, P. McDonald, V. A. Fadok, P. M. Henson and D. L. Bratton (2002). "Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(4): 404-12.
172. Hooper, N. M., E. H. Karran and A. J. Turner (1997). "Membrane protein secretases." Biochem J **321** (Pt 2): 265-79.
173. Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto and N. Yamamoto (1994). "Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism." Eur J Immunol **24**(8): 1945-8.
174. Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto and O. Silvennoinen (1995). "Signaling through the hematopoietic cytokine receptors." Annu Rev Immunol **13**: 369-98.
175. Inagaki-Ohara, K., H. Nishimura, A. Mitani and Y. Yoshikai (1997). "Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice." Eur J Immunol **27**(11): 2885-91.
176. Jablonska, E., L. Piotrowski, M. Kiluk, J. Jablonski, Z. Grabowska and W. Markiewicz (2001). "Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients." Cytokine **16**(5): 173-7.
177. Jacobs, C. A., D. H. Lynch, E. R. Roux, R. Miller, B. Davis, M. B. Widmer, J. Wignall, T. VandenBos, L. S. Park and M. P. Beckmann (1991). "Characterization and pharmacokinetic parameters of recombinant soluble interleukin-4 receptor." Blood **77**(11): 2396-403.
178. Jacques, Y., B. Le Mauff, F. Boeffard, A. Godard and J. P. Soulillou (1987). "A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity." J Immunol **139**(7): 2308-16.
179. Johnston, J. A., C. M. Bacon, D. S. Finbloom, R. C. Rees, D. Kaplan, K. Shibuya, J. R. Ortaldo, S. Gupta, Y. Q. Chen, J. D. Giri and et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8705-9.
180. Johnston, J. A., M. Kawamura, R. A. Kirken, Y. Q. Chen, T. B. Blake, K. Shibuya, J. R. Ortaldo, D. W. McVicar and J. J. O'Shea (1994). "Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2." Nature **370**(6485): 151-3.

181. Jones, S. A., S. Horiuchi, D. Novick, N. Yamamoto and G. M. Fuller (1998). "Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells." Eur J Immunol **28**(11): 3514-22.
182. Jones, S. A., S. Horiuchi, N. Topley, N. Yamamoto and G. M. Fuller (2001). "The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease." Faseb J **15**(1): 43-58.
183. Jones, S. A. and S. Rose-John (2002). "The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 251-63.
184. Jonuleit, H., K. Wiedemann, G. Muller, J. Degwert, U. Hoppe, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells." J Immunol **158**(6): 2610-5.
185. Josimovic-Alasevic, O., H. Feldmeier, K. Zwingenberger, G. Harms, H. Hahn, M. Shrisuphanunt and T. Diamantstein (1988). "Interleukin 2 receptor in patients with localized and systemic parasitic diseases." Clin Exp Immunol **72**(2): 249-54.
186. Josimovic-Alasevic, O., T. Herrmann and T. Diamantstein (1988). "Demonstration of two distinct forms of released low-affinity type interleukin 2 receptors." Eur J Immunol **18**(11): 1855-7.
187. Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem **268**(1): 160-7.
188. Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh and M. Seiki (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." J Cell Biol **153**(5): 893-904.
189. Kakumu, S., A. Okumura, T. Ishikawa, M. Yano, A. Enomoto, H. Nishimura, K. Yoshioka and Y. Yoshika (1997). "Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease." Clin Exp Immunol **109**(3): 458-63.
190. Kamihira, S., S. Atogami, H. Sohda, S. Momita, Y. Yamada and M. Tomonaga (1994). "Significance of soluble interleukin-2 receptor levels for evaluation of the progression of adult T-cell leukemia." Cancer **73**(11): 2753-8.
191. Kanai, T., E. K. Thomas, Y. Yasutomi and N. L. Letvin (1996). "IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL." J Immunol **157**(8): 3681-7.
192. Kanakura, Y., H. Sugahara, H. Mitsui, H. Ikeda, T. Furitsu, H. Yagura, H. Kitayama, Y. Kanayama and Y. Matsuzawa (1993). "Functional expression of interleukin 2 receptor in a human factor-dependent megakaryoblastic leukemia cell line: evidence that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits interleukin 2 binding to its receptor." Cancer Res **53**(3): 675-80.
193. Kanazawa, T., M. L. Keeler and L. Varticovski (1994). "Serine-rich region of the IL-2 receptor beta-chain is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase." Cell Immunol **156**(2): 378-88.
194. Kanegane, H. and G. Tosato (1996). "Activation of naive and memory T cells by interleukin-15." Blood **88**(1): 230-5.
195. Karnitz, L. M., L. A. Burns, S. L. Sutor, J. Blenis and R. T. Abraham (1995). "Interleukin-2 triggers a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent MEK activation pathway." Mol Cell Biol **15**(6): 3049-57.
196. Karnitz, L. M., S. L. Sutor and R. T. Abraham (1994). "The Src-family kinase, Fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin 2-responsive T cell line." J Exp Med **179**(6): 1799-808.
197. Katsanis, E., Z. Xu, A. Panoskaltsis-Mortari, D. J. Weisdorf, M. B. Widmer and B. R. Blazar (1996). "IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice." Transplantation **62**(6): 872-5.

198. Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce and J. J. Peschon (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." J Exp Med **191**(5): 771-80.
199. Khan, I. A., M. Moretto, X. Q. Wei, M. Williams, J. D. Schwartzman and F. Y. Liew (2002). "Treatment with soluble interleukin-15R α exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8+ T cell response." J Exp Med **195**(11): 1463-70.
200. Kim, Y. S., W. Maslinski, X. X. Zheng, A. C. Stevens, X. C. Li, G. H. Tesch, V. R. Kelley and T. B. Strom (1998). "Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc gamma2a protein blocks delayed-type hypersensitivity." J Immunol **160**(12): 5742-8.
201. Kirman, I. and O. H. Nielsen (1996). "Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis." Am J Gastroenterol **91**(9): 1789-94.
202. Kobayashi, H., S. Dubois, N. Sato, H. Sabzevari, Y. Sakai, T. A. Waldmann and Y. Tagaya (2005). "Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance." Blood **105**(2): 721-7.
203. Koka, R., P. R. Burkett, M. Chien, S. Chai, F. Chan, J. P. Lodolce, D. L. Boone and A. Ma (2003). "Interleukin (IL)-15R[α]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[α]-deficient mice." J Exp Med **197**(8): 977-84.
204. Kondo, N., S. Kondo, A. Shimizu, T. Honjo and J. Hamuro (1988). "A soluble 'anchorminus' interleukin 2 receptor suppresses in vitro interleukin 2-mediated immune responses." Immunol Lett **19**(4): 299-307.
205. Koolwijk, P., N. Sidenius, E. Peters, C. F. Sier, R. Hanemaaijer, F. Blasi and V. W. van Hinsbergh (2001). "Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices." Blood **97**(10): 3123-31.
206. Korholz, D., P. Nussbaum, B. Pafferath, C. Mauz-Korholz, L. Hempel and S. Burdach (1994). "Activation of protein kinase C induces de novo synthesis of the soluble interleukin-6 receptor in human B cells." Scand J Immunol **40**(5): 515-20.
207. Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M. T. Gillespie, T. J. Martin and T. Suda (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest **103**(9): 1345-52.
208. Kotenko, S. V., L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R. P. Donnelly and S. Pestka (2001). "Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity." J Immunol **166**(12): 7096-103.
209. Kottlil, S., T. W. Chun, S. Moir, S. Liu, M. McLaughlin, C. W. Hallahan, F. Maldarelli, L. Corey and A. S. Fauci (2003). "Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function." J Infect Dis **187**(7): 1038-45.
210. Kozak, M. (1992). "Regulation of translation in eukaryotic systems." Annu Rev Cell Biol **8**: 197-225.
211. Krause, H., B. Jandrig, C. Wernicke, S. Bulfone-Paus, T. Pohl and T. Diamantstein (1996). "Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15)." Cytokine **8**(9): 667-74.
212. Ku, C. C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler and P. Marrack (2000). "Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines." Science **288**(5466): 675-8.
213. Kuhns, D. B., W. G. Alvord and J. I. Gallin (1995). "Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans." J Infect Dis **171**(1): 145-52.
214. Kumaki, N., D. M. Anderson, D. Cosman and S. Kumaki (1996). "Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells." Curr Eye Res **15**(8): 876-82.

215. Kumaki, S., R. Armitage, M. Ahdieh, L. Park and D. Cosman (1996). "Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells." Eur J Immunol **26**(6): 1235-9.
216. Kumaki, S., H. D. Ochs, M. Timour, K. Schooley, M. Ahdieh, H. Hill, K. Sugamura, D. Anderson, Q. Zhu, D. Cosman and et al. (1995). "Characterization of B-cell lines established from two X-linked severe combined immunodeficiency patients: interleukin-15 binds to the B cells but is not internalized efficiently." Blood **86**(4): 1428-36.
217. Kuniyoshi, J. S., C. J. Kuniyoshi, A. M. Lim, F. Y. Wang, E. R. Bade, R. Lau, E. K. Thomas and J. S. Weber (1999). "Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells." Cell Immunol **193**(1): 48-58.
218. Kurowska, M., W. Rudnicka, E. Kontny, I. Janicka, M. Chorazy, J. Kowalczewski, M. Ziolkowska, S. Ferrari-Lacraz, T. B. Strom and W. Maslinski (2002). "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2." J Immunol **169**(4): 1760-7.
219. Kurowska, M., W. Rudnicka, D. Maslinska and W. Maslinski (2002). "Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain." Ann N Y Acad Sci **966**: 441-5.
220. Kurschner, C., G. Garotta and Z. Dembic (1992). "Construction, purification, and characterization of new interferon gamma (IFN gamma) inhibitor proteins. Three IFN gamma receptor-immunoglobulin hybrid molecules." J Biol Chem **267**(13): 9354-60.
221. Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, A. Timmermann, A. Kuster, H. Dahmen, I. Tacke, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (2000). "Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130." J Immunol **164**(1): 273-82.
222. Kurys, G., Y. Tagaya, R. Bamford, J. A. Hanover and T. A. Waldmann (2000). "The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15." J Biol Chem **275**(39): 30653-9.
223. Lai, Y. G., V. Gelfanov, V. Gelfanova, L. Kulik, C. L. Chu, S. W. Jeng and N. S. Liao (1999). "IL-15 promotes survival but not effector function differentiation of CD8⁺ TCR α beta⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes." J Immunol **163**(11): 5843-50.
224. Lantz, M., S. Malik, M. L. Slevin and I. Olsson (1990). "Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans." Cytokine **2**(6): 402-6.
225. Layton, J. E., N. E. Hall, F. Connell, J. Venhorst and H. R. Treutlein (2001). "Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor." J Biol Chem **276**(39): 36779-87.
226. Leeuwenberg, J. F., M. A. Dentener and W. A. Buurman (1994). "Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes. Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein." J Immunol **152**(10): 5070-6.
227. Leroy, S., S. Dubois, I. Tenaud, N. Chebassier, A. Godard, Y. Jacques and B. Dreno (2001). "Interleukin-15 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome)." Br J Dermatol **144**(5): 1016-23.
228. Levine, S. J. (2004). "Mechanisms of soluble cytokine receptor generation." J Immunol **173**(9): 5343-8.
229. Li, X. C., G. Demirci, S. Ferrari-Lacraz, C. Groves, A. Coyle, T. R. Malek and T. B. Strom (2001). "IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo." Nat Med **7**(1): 114-8.
230. Li, X. C., P. Roy-Chaudhury, W. W. Hancock, R. Manfro, M. S. Zand, Y. Li, X. X. Zheng, P. W. Nickerson, J. Steiger, T. R. Malek and T. B. Strom (1998). "IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection." J Immunol **161**(2): 890-6.

231. Lin, J. X., T. S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J. A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E. T. Bloom, J. Mietz, S. John and et al. (1995). "The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15." Immunity **2**(4): 331-9.
232. Lin, S. J., R. L. Roberts, B. J. Ank, Q. H. Nguyen, E. K. Thomas and E. R. Stiehm (1998). "Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on activated natural killer (ANK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in HIV infection." J Clin Immunol **18**(5): 335-45.
233. Ling, P., M. K. Gately, U. Gubler, A. S. Stern, P. Lin, K. Hollfelder, C. Su, Y. C. Pan and J. Hakimi (1995). "Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity." J Immunol **154**(1): 116-27.
234. Liu, Z., K. Geboes, S. Colpaert, G. R. D'Haens, P. Rutgeerts and J. L. Ceuppens (2000). "IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production." J Immunol **164**(7): 3608-15.
235. Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin and A. Ma (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." Immunity **9**(5): 669-76.
236. Lotze, M. T., M. C. Custer, S. O. Sharrow, L. A. Rubin, D. L. Nelson and S. A. Rosenberg (1987). "In vivo administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer: development of interleukin-2 receptor positive cells and circulating soluble interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration." Cancer Res **47**(8): 2188-95.
237. Loughnan, M. S. and G. J. Nossal (1989). "Interleukins 4 and 5 control expression of IL-2 receptor on murine B cells through independent induction of its two chains." Nature **340**(6228): 76-9.
238. Lowenthal, J. W. and W. C. Greene (1987). "Contrasting interleukin 2 binding properties of the alpha (p55) and beta (p70) protein subunits of the human high-affinity interleukin 2 receptor." J Exp Med **166**(4): 1156-61.
239. Lowenthal, J. W., C. Tougne, H. R. MacDonald, K. A. Smith and M. Nabholz (1985). "Antigenic stimulation regulates the expression of IL 2 receptors in a cytolytic T lymphocyte clone." J Immunol **134**(2): 931-9.
240. Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle and N. J. Maihle (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." Cytokine **4**(2): 96-100.
241. Ma, Y., H. E. Hurst and R. Fernandez-Botran (1996). "Soluble cytokine receptors as carrier proteins: effects of soluble interleukin-4 receptors on the pharmacokinetics of murine interleukin-4." J Pharmacol Exp Ther **279**(1): 340-50.
242. Mackiewicz, A., H. Schooltink, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1992). "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins." J Immunol **149**(6): 2021-7.
243. Maeda, M., N. Arima, Y. Daitoku, M. Kashihara, H. Okamoto, T. Uchiyama, K. Shirono, M. Matsuoka, T. Hattori, K. Takatsuki and et al. (1987). "Evidence for the interleukin-2 dependent expansion of leukemic cells in adult T cell leukemia." Blood **70**(5): 1407-11.
244. Maeda, T., M. Yamaguchi, T. Taga, T. Kishimoto, K. Wada, H. Ikegami, H. Kurachi and A. Miyake (1994). "Decidua is a possible source of serum mouse soluble interleukin-6 receptor (msIL-6R): gestational profile of serum msIL-6R concentration." Biochem Biophys Res Commun **205**(2): 998-1003.
245. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, B. Davison, C. A. Jacobs, F. D. Finkelman and W. C. Fanslow (1994). "In vivo biological effects of recombinant soluble interleukin-4 receptor." Proc Soc Exp Biol Med **206**(3): 233-7.
246. Mangi, M. H. and A. C. Newland (1999). "Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions." Cytokines Cell Mol Ther **5**(2): 87-95.
247. Mariner, J. M., V. Lantz, T. A. Waldmann and N. Azimi (2001). "Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site." J Immunol **166**(4): 2602-9.

248. Mariner, J. M., Y. Mamane, J. Hiscott, T. A. Waldmann and N. Azimi (2002). "IFN regulatory factor 4 participates in the human T cell lymphotropic virus type I-mediated activation of the IL-15 receptor alpha promoter." J Immunol **168**(11): 5667-74.
249. Marks-Konczalik, J., S. Dubois, J. M. Losi, H. Sabzevari, N. Yamada, L. Feigenbaum, T. A. Waldmann and Y. Tagaya (2000). "IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11445-50.
250. Mastroianni, C. M., G. d'Ettorre, G. Forcina, M. Lichtner, F. Mengoni, C. D'Agostino, A. Corpolongo, A. P. Massetti and V. Vullo (2000). "Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection." Blood **96**(5): 1979-84.
251. Mastroianni, C. M., G. d'Ettorre, G. Forcina and V. Vullo (2004). "Teaching tired T cells to fight HIV: time to test IL-15 for immunotherapy?" Trends Immunol **25**(3): 121-5.
252. Masuda, A., T. Matsuguchi, K. Yamaki, T. Hayakawa, M. Kubo, W. J. LaRochelle and Y. Yoshikai (2000). "Interleukin-15 induces rapid tyrosine phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells." J Biol Chem **275**(38): 29331-7.
253. Masuda, A., T. Matsuguchi, K. Yamaki, T. Hayakawa and Y. Yoshikai (2001). "Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression." J Biol Chem **276**(28): 26107-13.
254. Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli and D. F. Tough (2001). "IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation." J Immunol **167**(3): 1179-87.
255. McDonald, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini and M. A. Cassatella (1998). "Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils." Blood **92**(12): 4828-35.
256. McInnes, I. B., J. al-Mughales, M. Field, B. P. Leung, F. P. Huang, R. Dixon, R. D. Sturrock, P. C. Wilkinson and F. Y. Liew (1996). "The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis." Nat Med **2**(2): 175-82.
257. McInnes, I. B., B. P. Leung, R. D. Sturrock, M. Field and F. Y. Liew (1997). "Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis." Nat Med **3**(2): 189-95.
258. Meazza, R., S. Basso, A. Gaggero, D. Detotero, L. Trentin, R. Pereno, B. Azzarone and S. Ferrini (1998). "Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor beta/gamma." Int J Cancer **78**(2): 189-95.
259. Meazza, R., A. Gaggero, F. Neglia, S. Basso, S. Sforzini, R. Pereno, B. Azzarone and S. Ferrini (1997). "Expression of two interleukin-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides." Eur J Immunol **27**(5): 1049-54.
260. Meazza, R., S. Verdiani, R. Biassoni, M. Coppolecchia, A. Gaggero, A. M. Orengo, M. P. Colombo, B. Azzarone and S. Ferrini (1996). "Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines." Oncogene **12**(10): 2187-92.
261. Meissner, U., H. Blum, M. Schnare, M. Rollinghoff and A. Gessner (2001). "A soluble form of the murine common gamma chain is present at high concentrations in vivo and suppresses cytokine signaling." Blood **97**(1): 183-91.
262. Merberg, D. M., S. F. Wolf and S. C. Clark (1992). "Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family." Immunol Today **13**(2): 77-8.
263. Mezyk, R., M. Bzowska and J. Bereta (2003). "Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." Acta Biochim Pol **50**(3): 625-45.

264. Migone, T. S., S. Rodig, N. A. Cacalano, M. Berg, R. D. Schreiber and W. J. Leonard (1998). "Functional cooperation of the interleukin-2 receptor beta chain and Jak1 in phosphatidylinositol 3-kinase recruitment and phosphorylation." Mol Cell Biol **18**(11): 6416-22.
265. Mingari, M. C., M. Ponte, S. Bertone, F. Schiavetti, C. Vitale, R. Bellomo, A. Moretta and L. Moretta (1998). "HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1172-7.
266. Miyazaki, T., A. Takaoka, L. Nogueira, I. Dikic, H. Fujii, S. Tsujino, Y. Mitani, M. Maeda, J. Schlessinger and T. Taniguchi (1998). "Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway." Genes Dev **12**(6): 770-5.
267. Mohamadzadeh, M., F. Berard, G. Essert, C. Chalouni, B. Pulendran, J. Davoust, G. Bridges, A. K. Palucka and J. Banchereau (2001). "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells." J Exp Med **194**(7): 1013-20.
268. Mohamadzadeh, M., A. Takashima, I. Dougherty, J. Knop, P. R. Bergstresser and P. D. Cruz, Jr. (1995). "Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin." J Immunol **155**(9): 4492-6.
269. Mohler, K. M., D. S. Torrance, C. A. Smith, R. G. Goodwin, K. E. Stremmler, V. P. Fung, H. Madani and M. B. Widmer (1993). "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists." J Immunol **151**(3): 1548-61.
270. Monson, N. L., T. J. Fenske, S. Wei, A. J. Okragly, J. L. de Jong, M. Haak-Frendscho, J. O'Shea, J. Djeu and P. M. Sondel (2001). "A p74 common gamma receptor chain isoform facilitates IL-2 and IL-15 responses by the myelomonocytic cell line Tf-1beta2." J Leukoc Biol **69**(3): 419-25.
271. Montero-Julian, F. A. (2001). "The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(4): 583-97.
272. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
273. Mortier, E., J. Bernard, A. Plet and Y. Jacques (2004). "Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist." J Immunol **173**(3): 1681-8.
274. Mosley, B., M. P. Beckmann, C. J. March, R. L. Idzerda, S. D. Gimpel, T. VandenBos, D. Friend, A. Alpert, D. Anderson, J. Jackson and et al. (1989). "The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms." Cell **59**(2): 335-48.
275. Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer and et al. (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." Nature **385**(6618): 733-6.
276. Mottonen, M., P. Isomaki, R. Luukkainen, P. Toivanen, J. Punnonen and O. Lassila (2000). "Interleukin-15 up-regulates the expression of CD154 on synovial fluid T cells." Immunology **100**(2): 238-44.
277. Mueller, Y. M., P. M. Bojczuk, E. S. Halstead, A. H. Kim, J. Witek, J. D. Altman and P. D. Katsikis (2003). "IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells." Blood **101**(3): 1024-9.
278. Mueller, Y. M., V. Makar, P. M. Bojczuk, J. Witek and P. D. Katsikis (2003). "IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells." Int Immunol **15**(1): 49-58.
279. Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." Eur J Immunol **23**(2): 473-80.

280. Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1992). "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 794-800.
281. Muller, C., P. Knoflach and C. C. Zielinski (1989). "Soluble interleukin 2 receptor in acute viral hepatitis and chronic liver disease." Hepatology **10**(6): 928-32.
282. Muller-Newen, G., A. Kuster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes and P. C. Heinrich (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." J Immunol **161**(11): 6347-55.
283. Murata, T., J. Taguchi, R. K. Puri and H. Mohri (1999). "Sharing of receptor subunits and signal transduction pathway between the IL-4 and IL-13 receptor system." Int J Hematol **69**(1): 13-20.
284. Murray, A. M., B. Simm and K. W. Beagley (1998). "Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development." Cytokine **10**(5): 337-45.
285. Musso, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, D. Ravarino, M. Giovarelli, F. Malavasi, A. N. Ponzi, R. Paus and S. Bulfone-Paus (1999). "Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15." Blood **93**(10): 3531-9.
286. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui and H. Okamura (2001). "Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 53-72.
287. Naora, H. and M. L. Gougeon (1999). "Enhanced survival and potent expansion of the natural killer cell population of HIV-infected individuals by exogenous interleukin-15." Immunol Lett **68**(2-3): 359-67.
288. Neely, G. G., S. Epelman, L. L. Ma, P. Colarusso, C. J. Howlett, E. K. Amankwah, A. C. McIntyre, S. M. Robbins and C. H. Mody (2004). "Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling." J Immunol **172**(7): 4225-34.
289. Neely, G. G., S. M. Robbins, E. K. Amankwah, S. Epelman, H. Wong, J. C. Spurrell, K. K. Jandu, W. Zhu, D. K. Fogg, C. B. Brown and C. H. Mody (2001). "Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis." J Immunol **167**(9): 5011-7.
290. Nelson, B. H. and D. M. Willerford (1998). "Biology of the interleukin-2 receptor." Adv Immunol **70**: 1-81.
291. Nieto, M., M. A. del Pozo and F. Sanchez-Madrid (1996). "Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes." Eur J Immunol **26**(6): 1302-7.
292. Nishimura, H., A. Fujimoto, N. Tamura, T. Yajima, W. Wajjwalku and Y. Yoshikai (2005). "A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing." Faseb J **19**(1): 19-28.
293. Nishimura, H., T. Yajima, Y. Naiki, H. Tsunobuchi, M. Umemura, K. Itano, T. Matsuguchi, M. Suzuki, P. S. Ohashi and Y. Yoshikai (2000). "Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo." J Exp Med **191**(1): 157-70.
294. Nishiyama, R., T. Sakaguchi, T. Kinugasa, X. Gu, R. P. MacDermott, D. K. Podolsky and H. C. Reinecker (2001). "Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions." J Biol Chem **276**(38): 35571-80.
295. Noguchi, M., S. Adelstein, X. Cao and W. J. Leonard (1993). "Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene." J Biol Chem **268**(18): 13601-8.
296. Noguchi, M., Y. Nakamura, S. M. Russell, S. F. Ziegler, M. Tsang, X. Cao and W. J. Leonard (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor." Science **262**(5141): 1877-80.

297. Nosaka, T., J. M. van Deursen, R. A. Tripp, W. E. Thierfelder, B. A. Witthuhn, A. P. McMickle, P. C. Doherty, G. C. Grosveld and J. N. Ihle (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking Jak3." Science **270**(5237): 800-2.
298. Novick, D., H. Engemann, D. Wallach and M. Rubinstein (1989). "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine." J Exp Med **170**(4): 1409-14.
299. Novick, D., S. H. Kim, G. Fantuzzi, L. L. Reznikov, C. A. Dinarello and M. Rubinstein (1999). "Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response." Immunity **10**(1): 127-36.
300. O'Shea, J. J., M. Gadina and R. D. Schreiber (2002). "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway." Cell **109** Suppl: S121-31.
301. O'Shea, J. J. and W. E. Paul (2002). "Regulation of T(H)1 differentiation--controlling the controllers." Nat Immunol **3**(6): 506-8.
302. Ogasawara, K., S. Hida, N. Azimi, Y. Tagaya, T. Sato, T. Yokochi-Fukuda, T. A. Waldmann, T. Taniguchi and S. Taki (1998). "Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells." Nature **391**(6668): 700-3.
303. Ogata, Y., A. Kukita, T. Kukita, M. Komine, A. Miyahara, S. Miyazaki and O. Kohashi (1999). "A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2." J Immunol **162**(5): 2754-60.
304. Ohara, J. and W. E. Paul (1988). "Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 8221-5.
305. Ohkawa, T., S. Seki, H. Dobashi, Y. Koike, Y. Habu, K. Ami, H. Hiraide and I. Sekine (2001). "Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells." Immunology **103**(3): 281-90.
306. Ohta, N., T. Hiroi, M. N. Kweon, N. Kinoshita, M. H. Jang, T. Mashimo, J. Miyazaki and H. Kiyono (2002). "IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation." J Immunol **169**(1): 460-8.
307. Ohteki, T., S. Ho, H. Suzuki, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1997). "Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development." J Immunol **159**(12): 5931-5.
308. Ohteki, T., K. Suzue, C. Maki, T. Ota and S. Koyasu (2001). "Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response." Nat Immunol **2**(12): 1138-43.
309. Ohteki, T., H. Yoshida, T. Matsuyama, G. S. Duncan, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1998). "The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells." J Exp Med **187**(6): 967-72.
310. Onu, A., T. Pohl, H. Krause and S. Bulfone-Paus (1997). "Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms." J Immunol **158**(1): 255-62.
311. Oppenheimer-Marks, N., R. I. Brezinschek, M. Mohamadzaheh, R. Vita and P. E. Lipsky (1998). "Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo." J Clin Invest **101**(6): 1261-72.
312. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.

313. Osawa, H., O. Josimovic-Alasevic and T. Diamantstein (1986). "Interleukin 2 receptors are released by cells in vitro and in vivo. I. Detection of soluble IL 2 receptors in cell culture supernatants and in the serum of mice by an immunoradiometric assay." Eur J Immunol **16**(4): 467-9.
314. Ozaki, K. and W. J. Leonard (2002). "Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy." J Biol Chem **277**(33): 29355-8.
315. Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K. P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A. M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D. M. Rennick, R. A. Kastelein, R. de Waal Malefyt and K. W. Moore (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." J Immunol **168**(11): 5699-708.
316. Parrish-Novak, J., S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly and D. Foster (2000). "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function." Nature **408**(6808): 57-63.
317. Pashenkov, M., M. Mustafa, P. Kivisakk and H. Link (1999). "Levels of interleukin-15-expressing blood mononuclear cells are elevated in multiple sclerosis." Scand J Immunol **50**(3): 302-8.
318. Pauwels, R. A., G. G. Brusselle, K. G. Tournoy, B. N. Lambrecht and J. C. Kips (1998). "Cytokines and their receptors as therapeutic targets in asthma." Clin Exp Allergy **28 Suppl 3**: 1-5.
319. Pavlakis, M., J. Strehlau, M. Lipman, M. Shapiro, W. Maslinski and T. B. Strom (1996). "Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection." Transplantation **62**(4): 543-5.
320. Pelletier, M., C. Ratthe and D. Girard (2002). "Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2." FEBS Lett **532**(1-2): 164-70.
321. Pennica, D., T. A. Swanson, K. J. Shaw, W. J. Kuang, C. L. Gray, B. G. Beatty and W. I. Wood (1996). "Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization." Cytokine **8**(3): 183-9.
322. Pereno, R., J. Giron-Michel, A. Gaggero, E. Cazes, R. Meazza, M. Monetti, E. Monaco, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini and B. Azzarone (2000). "IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha." Oncogene **19**(45): 5153-62.
323. Perera, L. P., C. K. Goldman and T. A. Waldmann (1999). "IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes." J Immunol **162**(5): 2606-12.
324. Perkins, J. D., D. L. Nelson, J. Rakela, P. M. Grambsch and R. A. Krom (1989). "Soluble interleukin 2 receptor level in liver allograft recipients: an indicator of rejection." Transplant Proc **21**(1 Pt 2): 2275-6.
325. Perkins, S. J., P. I. Haris, R. B. Sim and D. Chapman (1988). "A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods." Biochemistry **27**(11): 4004-12.
326. Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Mullberg, E. Wolf, G. Brem, K. H. Meyer zum Buschenfelde and S. Rose-John (1996). "The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6." J Exp Med **183**(4): 1399-406.
327. Peters, M., A. M. Muller and S. Rose-John (1998). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis." Blood **92**(10): 3495-504.

328. Pettit, D. K., T. P. Bonnert, J. Eisenman, S. Srinivasan, R. Paxton, C. Beers, D. Lynch, B. Miller, J. Yost, K. H. Grabstein and W. R. Gombotz (1997). "Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling." J Biol Chem **272**(4): 2312-8.
329. Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J. F. Bazan, J. H. Phillips, T. K. McClanahan, R. de Waal Malefyt and R. A. Kastelein (2004). "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27." J Immunol **172**(4): 2225-31.
330. Pflanz, S., I. Tacke, J. Grotzinger, Y. Jacques, S. Minvielle, H. Dahmen, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (1999). "A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130." FEBS Lett **450**(1-2): 117-22.
331. Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick and R. A. Kastelein (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity **16**(6): 779-90.
332. Pirtskhalaishvili, G., G. V. Shurin, C. Esche, Q. Cai, R. R. Salup, S. N. Bykovskaia, M. T. Lotze and M. R. Shurin (2000). "Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins." Br J Cancer **83**(4): 506-13.
333. Presky, D. H., H. Yang, L. J. Minetti, A. O. Chua, N. Nabavi, C. Y. Wu, M. K. Gately and U. Gubler (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14002-7.
334. Prince, H. E., S. Kleinman and A. E. Williams (1988). "Soluble IL-2 receptor levels in serum from blood donors seropositive for HIV." J Immunol **140**(4): 1139-41.
335. Puzanov, I. J., M. Bennett and V. Kumar (1996). "IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells." J Immunol **157**(10): 4282-5.
336. Qin, J. Z., R. Dummer, G. Burg and U. Dobbeling (1999). "Constitutive and interleukin-7/interleukin-15 stimulated DNA binding of Myc, Jun, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells." Blood **93**(1): 260-7.
337. Qin, J. Z., C. L. Zhang, J. Kamarashev, R. Dummer, G. Burg and U. Dobbeling (2001). "Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells." Blood **98**(9): 2778-83.
338. Ravichandran, K. S. and S. J. Burakoff (1994). "The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation." J Biol Chem **269**(3): 1599-602.
339. Reif, K., B. M. Burgering and D. A. Cantrell (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase." J Biol Chem **272**(22): 14426-33.
340. Renne, C., K. J. Kallen, J. Mullberg, T. Jostock, J. Grotzinger and S. Rose-John (1998). "A new type of cytokine receptor antagonist directly targeting gp130." J Biol Chem **273**(42): 27213-9.
341. Richards, J. M., R. Mick, J. M. Latta, K. Daly, M. J. Ratain, J. W. Vardiman and H. M. Golomb (1990). "Serum soluble interleukin-2 receptor is associated with clinical and pathologic disease status in hairy cell leukemia." Blood **76**(10): 1941-5.
342. Richter, W. F., H. Gallati and C. D. Schiller (1999). "Animal pharmacokinetics of the tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin fusion protein lenercept and their extrapolation to humans." Drug Metab Dispos **27**(1): 21-5.
343. Robledo, O., M. Fourcin, S. Chevalier, C. Guillet, P. Auguste, A. Pouplard-Barthelaix, D. Pennica and H. Gascan (1997). "Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component." J Biol Chem **272**(8): 4855-63.

344. Rodig, S. J., M. A. Meraz, J. M. White, P. A. Lampe, J. K. Riley, C. D. Arthur, K. L. King, K. C. Sheehan, L. Yin, D. Pennica, E. M. Johnson, Jr. and R. D. Schreiber (1998). "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses." Cell **93**(3): 373-83.
345. Romagnani, S. (2000). "T-cell subsets (Th1 versus Th2)." Ann Allergy Asthma Immunol **85**(1): 9-18; quiz 18, 21.
346. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings (2001). "Type 1 T regulatory cells." Immunol Rev **182**: 68-79.
347. Rose-John, S. (2003). "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors." Acta Biochim Pol **50**(3): 603-11.
348. Rose-John, S. and P. C. Heinrich (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." Biochem J **300** (Pt 2): 281-90.
349. Ross, M. E. and M. A. Caligiuri (1997). "Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response." Blood **89**(3): 910-8.
350. Rubin, L. A., C. C. Kurman, M. E. Fritz, W. E. Biddison, B. Boutin, R. Yarchoan and D. L. Nelson (1985). "Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro." J Immunol **135**(5): 3172-7.
351. Rubin, L. A. and D. L. Nelson (1990). "The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application." Ann Intern Med **113**(8): 619-27.
352. Ruchatz, H., B. P. Leung, X. Q. Wei, I. B. McInnes and F. Y. Liew (1998). "Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology." J Immunol **160**(11): 5654-60.
353. Ruckert, R., K. Brandt, A. Braun, H. G. Hoymann, U. Herz, V. Budagian, H. Durkop, H. Renz and S. Bulfone-Paus (2005). "Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo." J Immunol **174**(9): 5507-15.
354. Ruhl, S., D. H. Pluznik and G. M. Feldman (1993). "Soluble interleukin-4 receptor production by murine myeloid progenitor cells: induction by interleukin-6 and interferon-gamma." Cytokine **5**(2): 144-9.
355. Russell, S. M., J. A. Johnston, M. Noguchi, M. Kawamura, C. M. Bacon, M. Friedmann, M. Berg, D. W. McVicar, B. A. Witthuhn, O. Silvennoinen and et al. (1994). "Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID." Science **266**(5187): 1042-5.
356. Saikh, K. U., A. S. Khan, T. Kissner and R. G. Ulrich (2001). "IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells." Clin Exp Immunol **126**(3): 447-55.
357. Sakai, T., K. Kusugami, H. Nishimura, T. Ando, T. Yamaguchi, M. Ohsuga, K. Ina, A. Enomoto, Y. Kimura and Y. Yoshikai (1998). "Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **114**(6): 1237-43.
358. Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart and M. Parmentier (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.
359. Sancho, D., M. Yanez-Mo, R. Tejedor and F. Sanchez-Madrid (1999). "Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15." Blood **93**(3): 886-96.
360. Sandau, M. M., K. S. Schluns, L. Lefrancois and S. C. Jameson (2004). "Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells." J Immunol **173**(11): 6537-41.

361. Sauve, K., M. Nachman, C. Spence, P. Bailon, E. Campbell, W. H. Tsien, J. A. Kondas, J. Hakimi and G. Ju (1991). "Localization in human interleukin 2 of the binding site to the alpha chain (p55) of the interleukin 2 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4636-40.
362. Schluns, K. S., E. C. Nowak, A. Cabrera-Hernandez, L. Puddington, L. Lefrancois and H. L. Aguila (2004). "Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5616-21.
363. Schulz, O., H. F. Sewell and F. Shakib (1998). "Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity." J Exp Med **187**(2): 271-5.
364. Schuster, B., M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhard, V. Matthews, J. Grotzinger, S. Rose-John and K. J. Kallen (2003). "Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF." J Biol Chem **278**(11): 9528-35.
365. Sebbag, M., S. L. Parry, F. M. Brennan and M. Feldmann (1997). "Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **27**(3): 624-32.
366. Seder, R. A. (1996). "High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4." J Immunol **156**(7): 2413-22.
367. Seigel, L. J., M. E. Harper, F. Wong-Staal, R. C. Gallo, W. G. Nash and S. J. O'Brien (1984). "Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1." Science **223**(4632): 175-8.
368. Semenzato, G., L. M. Bambara, D. Biasi, A. Frigo, F. Vinante, B. Zuppin, L. Trentin, C. Feruglio, M. Chilosi and G. Pizzolo (1988). "Increased serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." J Clin Immunol **8**(6): 447-52.
369. Sheu, B. C., S. M. Hsu, H. N. Ho, H. C. Lien, S. C. Huang and R. H. Lin (2001). "A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression." Cancer Res **61**(1): 237-42.
370. Shi, Y. F., M. Hill, A. Novak, Z. Q. Chen, R. X. Wang, C. C. Liew and G. B. Mills (1997). "Human hematopoietic cell express two forms of the cytokine receptor common gamma-chain (gamma c)." Cell Res **7**(2): 195-205.
371. Silva, M. A., J. Menezes, S. Wizman, R. Gendron, L. Oligny and E. G. Seidman (2003). "Cytokine tissue levels as markers of disease activity in pediatric Crohn disease." Pediatr Res **54**(4): 456-61.
372. Smith, C. A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M. P. Beckmann, R. Jerzy, S. K. Dower, D. Cosman and R. G. Goodwin (1990). "A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins." Science **248**(4958): 1019-23.
373. Smith, C. A., T. Farrah and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-62.
374. Smith, K. A. and D. A. Cantrell (1985). "Interleukin 2 regulates its own receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 864-8.
375. Smith, X. G., E. M. Bolton, H. Ruchatz, X. Wei, F. Y. Liew and J. A. Bradley (2000). "Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival." J Immunol **165**(6): 3444-50.
376. Strengell, M., S. Matikainen, J. Siren, A. Lehtonen, D. Foster, I. Julkunen and T. Sareneva (2003). "IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells." J Immunol **170**(11): 5464-9.
377. Sun, Y., P. Marz, U. Otten, J. Ge and S. Rose-John (2002). "The effect of gp130 stimulation on glutamate-induced excitotoxicity in primary hippocampal neurons." Biochem Biophys Res Commun **295**(2): 532-9.

378. Symons, J. A., J. A. Eastgate and G. W. Duff (1990). "A soluble binding protein specific for interleukin 1 beta is produced by activated mononuclear cells." Cytokine **2**(3): 190-8.
379. Symons, J. A., N. C. Wood, F. S. Di Giovine and G. W. Duff (1988). "Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity, IL-1 and IL-2 inhibition." J Immunol **141**(8): 2612-8.
380. Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." Annu Rev Immunol **15**: 797-819.
381. Tagaya, Y., J. D. Burton, Y. Miyamoto and T. A. Waldmann (1996). "Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells." Embo J **15**(18): 4928-39.
382. Tagaya, Y., G. Kurys, T. A. Thies, J. M. Losi, N. Azimi, J. A. Hanover, R. N. Bamford and T. A. Waldmann (1997). "Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14444-9.
383. Taichman, R., I. Merida, T. Torigoe, G. N. Gaulton and J. C. Reed (1993). "Evidence that protein tyrosine kinase p56-Lck regulates the activity of phosphatidylinositol-3'-kinase in interleukin-2-dependent T-cells." J Biol Chem **268**(27): 20031-6.
384. Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto and S. Akira (1998). "Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice." J Immunol **161**(9): 4652-60.
385. Takemoto, S., J. C. Mulloy, A. Cereseto, T. S. Migone, B. K. Patel, M. Matsuoka, K. Yamaguchi, K. Takatsuki, S. Kamihira, J. D. White, W. J. Leonard, T. Waldmann and G. Franchini (1997). "Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13897-902.
386. Takeshita, T., H. Asao, K. Ohtani, N. Ishii, S. Kumaki, N. Tanaka, H. Munakata, M. Nakamura and K. Sugamura (1992). "Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor." Science **257**(5068): 379-82.
387. Thery, C., L. Zitvogel and S. Amigorena (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-79.
388. Thomis, D. C., C. B. Gurniak, E. Tivol, A. H. Sharpe and L. J. Berg (1995). "Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3." Science **270**(5237): 794-7.
389. Timmermann, A., A. Kuster, I. Kurth, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (2002). "A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor." Eur J Biochem **269**(11): 2716-26.
390. Tinhofer, I., I. Marschitz, T. Henn, A. Egle and R. Greil (2000). "Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma." Blood **95**(2): 610-8.
391. Tokano, Y., A. Murashima, Y. Takasaki, H. Hashimoto, K. Okumura and S. Hirose (1989). "Relation between soluble interleukin 2 receptor and clinical findings in patients with systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **48**(10): 803-9.
392. Tokiwa, G., I. Dikic, S. Lev and J. Schlessinger (1996). "Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway." Science **273**(5276): 792-4.
393. Treiger, B. F., W. J. Leonard, P. Svetlik, L. A. Rubin, D. L. Nelson and W. C. Greene (1986). "A secreted form of the human interleukin 2 receptor encoded by an "anchor minus" cDNA." J Immunol **136**(11): 4099-105.
394. Trentin, L., A. Cerutti, R. Zambello, R. Sancetta, C. Tassinari, M. Facco, F. Adami, F. Rodeghiero, C. Agostini and G. Semenzato (1996). "Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders." Blood **87**(8): 3327-35.

395. Trinchieri, G., S. Pflanz and R. A. Kastelein (2003). "The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses." Immunity **19**(5): 641-4.
396. Tsudo, M., R. W. Kozak, C. K. Goldman and T. A. Waldmann (1986). "Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9694-8.
397. Upton, C., J. L. Macen, M. Schreiber and G. McFadden (1991). "Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence." Virology **184**(1): 370-82.
398. Velasco-Loyden, G., J. Arribas and F. Lopez-Casillas (2004). "The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1." J Biol Chem **279**(9): 7721-33.
399. Voss, S. D., J. A. Hank, C. A. Nobis, P. Fisch, J. A. Sosman and P. M. Sondel (1989). "Serum levels of the low-affinity interleukin-2 receptor molecule (TAC) during IL-2 therapy reflect systemic lymphoid mass activation." Cancer Immunol Immunother **29**(4): 261-9.
400. Wagner, D. K., J. York-Jolley, T. R. Malek, J. A. Berzofsky and D. L. Nelson (1986). "Antigen-specific murine T cell clones produce soluble interleukin 2 receptor on stimulation with specific antigens." J Immunol **137**(2): 592-6.
401. Wajant, H., F. Henkler and P. Scheurich (2001). "The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators." Cell Signal **13**(6): 389-400.
402. Waldmann, T. A., S. Dubois and Y. Tagaya (2001). "Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy." Immunity **14**(2): 105-10.
403. Wang, H. M. and K. A. Smith (1987). "The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure." J Exp Med **166**(4): 1055-69.
404. Washizu, J., H. Nishimura, N. Nakamura, Y. Nimura and Y. Yoshikai (1998). "The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene." Immunogenetics **48**(1): 1-7.
405. Watford, W. T., M. Moriguchi, A. Morinobu and J. J. O'Shea (2003). "The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses." Cytokine Growth Factor Rev **14**(5): 361-8.
406. Wei, X., M. Orchardson, J. A. Gracie, B. P. Leung, B. Gao, H. Guan, W. Niedbala, G. K. Paterson, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2001). "The Sushi domain of soluble IL-15 receptor alpha is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo." J Immunol **167**(1): 277-82.
407. Weltman, J. K. and A. S. Karim (2000). "IL-5: biology and potential therapeutic applications." Expert Opin Investig Drugs **9**(3): 491-6.
408. Wilkinson, P. C. and F. Y. Liew (1995). "Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15." J Exp Med **181**(3): 1255-9.
409. Wolf, S. F., P. A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R. M. Hewick and et al. (1991). "Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells." J Immunol **146**(9): 3074-81.
410. Wrighton, N., L. A. Campbell, N. Harada, A. Miyajima and F. Lee (1992). "The murine interleukin-4 receptor gene: genomic structure, expression and potential for alternative splicing." Growth Factors **6**(2): 103-18.
411. Wu, C., R. R. Warrior, X. Wang, D. H. Presky and M. K. Gately (1997). "Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells." Eur J Immunol **27**(1): 147-54.
412. Xu, W., S. R. Presnell, J. Parrish-Novak, W. Kindsvogel, S. Jaspers, Z. Chen, S. R. Dillon, Z. Gao, T. Gilbert, K. Madden, S. Schlutsmeier, L. Yao, T. E. Whitmore, Y. Chandrasekhar, F. J. Grant, M. Maurer, L. Jelinek, H.

- Storey, T. Brender, A. Hammond, S. Topouzis, C. H. Clegg and D. C. Foster (2001). "A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9511-6.
413. Xu, X., S. H. Kang, O. Heidenreich, M. Okerholm, J. J. O'Shea and M. I. Nerenberg (1995). "Constitutive activation of different Jak tyrosine kinases in human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax protein or virus-transformed cells." J Clin Invest **96**(3): 1548-55.
414. Yamada, Y., K. Sugawara, T. Hata, K. Tsuruta, R. Moriuchi, T. Maeda, S. Atogami, K. Murata, K. Fujimoto, T. Kohno, K. Tsukasaki, M. Tomonaga, Y. Hirakata and S. Kamihira (1998). "Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells." Blood **91**(11): 4265-72.
415. Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130." Embo J **12**(4): 1705-12.
416. Yodoi, J., Y. Tagaya, M. Okada, Y. Taniguchi, M. Hirata, M. Naramura and M. Maeda (1987). "Interleukin-2 receptor-inducing factor(s) in adult T cell leukemia." Acta Haematol **78 Suppl 1**: 56-63.
417. Yoshida, H., S. Hamano, G. Senaldi, T. Covey, R. Faggioni, S. Mu, M. Xia, A. C. Wakeham, H. Nishina, J. Potter, C. J. Saris and T. W. Mak (2001). "WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection." Immunity **15**(4): 569-78.
418. Yu, H., T. A. Fehniger, P. Fuchshuber, K. S. Thiel, E. Vivier, W. E. Carson and M. A. Caligiuri (1998). "Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15." Blood **92**(10): 3647-57.
419. Zambello, R., M. Facco, L. Trentin, R. Sancetta, C. Tassinari, A. Perin, A. Milani, G. Pizzolo, F. Rodeghiero, C. Agostini, R. Meazza, S. Ferrini and G. Semenzato (1997). "Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes." Blood **89**(1): 201-11.
420. Zamorano, J., H. Y. Wang, R. Wang, Y. Shi, G. D. Longmore and A. D. Keegan (1998). "Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression." J Immunol **160**(7): 3502-12.
421. Zaunders, J. J., L. Moutouh-de Parseval, S. Kitada, J. C. Reed, S. Rought, D. Genini, L. Leoni, A. Kelleher, D. A. Cooper, D. E. Smith, P. Grey, J. Estaquier, S. Little, D. D. Richman and J. Corbeil (2003). "Polyclonal proliferation and apoptosis of CCR5+ T lymphocytes during primary human immunodeficiency virus type 1 infection: regulation by interleukin (IL)-2, IL-15, and Bcl-2." J Infect Dis **187**(11): 1735-47.
422. Zhu, M. H., J. A. Berry, S. M. Russell and W. J. Leonard (1998). "Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-independent functional recruitment of Jak3 to IL-2Rbeta." J Biol Chem **273**(17): 10719-25.
423. Ziolkowska, M., A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska and W. Maslinski (2000). "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism." J Immunol **164**(5): 2832-8.
424. Zissel, G., I. Baumer, M. Schlaak and J. Muller-Quernheim (2000). "In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases." Eur Cytokine Netw **11**(1): 105-12.
425. Zurawski, S. M., F. Vega, Jr., E. L. Doyle, B. Huyghe, K. Flaherty, D. B. McKay and G. Zurawski (1993). "Definition and spatial location of mouse interleukin-2 residues that interact with its heterotrimeric receptor." Embo J **12**(13): 5113-9.

ANNEXES

ANNEXE I

ARTICLE :

Identification of an Interleukin-15 alpha Receptor-binding Site on Human Interleukin-15

(Bernard J., *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279(23) : 24313-22)

Identification of an Interleukin-15 α Receptor-binding Site on Human Interleukin-15*

Received for publication, November 13, 2003, and in revised form, March 2, 2004
Published, JBC Papers in Press, March 23, 2004, DOI 10.1074/jbc.M312458200

Jérôme Bernard^{‡§}, Catherine Harb[‡], Erwan Mortier^{‡¶}, Agnès Quémener[‡], Rob H. Melen^{||},
Claudine Vermot-Desroches^{**}, John Wijdeness^{**}, Peter van Dijken^{||}, Joachim Grötzinger^{‡‡},
Jerry W. Sloatstra^{||}, Ariane Plet[‡], and Yannick Jacques^{‡§§}

From the [‡]Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs, Unité INSERM 601, Institut de Biologie, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France, ^{||}Pepsan Systems, Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands, ^{**}Diaclone, 1 Bld A. Fleming, BP 1985, 25020 Besançon Cedex, France, and the ^{‡‡}Department of Biochemistry, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Olshausenstrasse 40, D-24098, Kiel, Germany

To identify the epitopes in human interleukin-15 (IL-15) that are responsible for binding to the interleukin-15 receptor α chain, antibody and receptor mapping by peptide scanning and site-directed mutagenesis was used. By using peptide scanning, we identified four regions in IL-15. The first region (⁸⁵CKECEELEEK⁹⁵) is located in the C-D loop and is recognized by a set of non-inhibitory antibodies. The second region (¹⁰²SFVH-IVQMFIN¹¹²) is located in helix D and is recognized by two antibodies that are inhibitory of IL-15 bio-activity but not of IL-15 binding to IL-15R α . The two remaining regions react with a recombinant soluble form of the IL-15R α ; the first (⁴⁴LLELQVISL⁵², peptide 1) corresponds to a sequence located in the B-helix and the second (⁶⁴ENLII⁶⁸, peptide 2) to a sequence located in helix C. The latter is also contained in the epitope recognized by an antibody (monoclonal antibody B-E29) that prevents IL-15 binding to IL-15R α . By site-directed mutagenesis, we confirmed that residues present in peptide 1 (Leu-45, Glu-46, Val-49, Ser-51, and Leu-52) and peptide 2 (Leu-66 and Ile-67) are involved in the binding of IL-15 to IL-15R α . Furthermore, the results presented indicate that residues in the second peptide (Glu-64, Asn-65, and Ile-68) participate in IL-2R β recruitment. This finding could have implications for the dynamics of receptor assembly. These results also indicate that the modes of interaction of IL-15 and IL-2 with their respective α chains are not completely analogous. Finally, some of the IL-15 mutants generated in this study displayed agonist or antagonist properties and may be useful as therapeutic agents.

Interleukin-15 (IL-15)¹ was identified as a new cytokine able to replace IL-2 in supporting the proliferation of a murine T cell

* This work was supported in part by Grant P00/3/5692 from the Association pour la Recherche sur le Cancer, INSERM, and CNRS. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de Vendée) and from the ARC.

¶ Recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies.

§§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-2-40-08-47-23; Fax: 33-2-40-35-66-97; E-mail: yjacques@nantes.inserm.fr.

¹ The abbreviations used are: IL, interleukin; rIL, recombinant IL; IL-15R α , IL-15 receptor α chain; NK, natural killer; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor; mAb, monoclonal antibody; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RIA, radioimmuno-

assay; DHFR, dihydrofolate reductase; PPL, preprolactin; WT, wild type. Both cytokines are structurally related and belong to the four α -helix bundle family (3). IL-15 was subsequently found to mimic most of the *in vitro* activities elicited by IL-2 *in vitro*, including induction of proliferation and cytotoxicity by activated T cells (1) and NK cells (2, 4), co-stimulation of B cell proliferation and immunoglobulin synthesis (5), and chemoattraction for T cells (6). This redundancy is explained by the common usage within their functional receptors of the IL-2R β / γ signaling complex. This IL-2R β / γ complex is a common intermediate affinity receptor for IL-2 and IL-15 ($K_d = 1$ nM), and both cytokines compete to bind to this receptor (7). Cytokine specificity is conferred by additional private chains, IL-2R α and IL-15R α , that are structurally related (8). These two chains contain structural domains (called sushi domains) previously found in some complement and adhesion molecules (9). IL-2R α contains two such domains, whereas IL-15R α contains only one. One noticeable difference is that IL-2 binds to its specific IL-2R α with an affinity ($K_d = 10$ nM) far lower than IL-15 to IL-15R α ($K_d = 0.05$ nM). Each specific chain can associate with the IL-2R β / γ complex to form a cytokine-specific, functional high affinity ($\alpha\beta\gamma$) receptor (10–12). Because of the sharing of this IL-2R β / γ complex, both cytokines trigger similar downstream signaling pathways including activation of Jak-1/Jak-3 tyrosine kinases and subsequent nuclear translocation of the phosphorylated Stat-3 and Stat-5, activation of lymphocyte-specific tyrosine kinase and spleen tyrosine kinases, activation of the mitogen-activated protein kinase pathway, and induction of B cell leukemia-2 (13, 14). In contrast to IL-2R β and IL-2R γ that are required for signal transduction, the specific receptors IL-2R α and IL-15R α have short intracellular tails (13 and 41 amino acids, respectively), and IL-2R α is considered to play no role in signal transduction. Although initial studies have pointed out the dispensable role of the intracellular tail of IL-15R α in signaling (8), more recent data suggest that IL-15R α might mediate certain intracellular functions (15–17).

In contrast to the general functional redundancy observed *in vitro*, several findings point to complementary and even opposing actions of IL-2 and IL-15 *in vivo*. Indeed, whereas IL-2 and IL-2R α gene expression is mainly restricted to the activated T cell compartment, IL-15 and IL-15R α transcripts are expressed by various cell types and tissues (monocytes, dendritic and stromal cells, keratinocytes, placenta, skeletal muscle, and heart) suggesting additional roles for the IL-15 system beyond the immune system (7, 8). Cells expressing IL-15R α in the absence of IL-2R β and/or IL-2R γ have been described, and

no assay; DHFR, dihydrofolate reductase; PPL, preprolactin; WT, wild type.

some of them respond to IL-15 (17, 18), suggesting the existence of new functional IL-15 receptor complexes not involving IL-2R β and/or IL-2R γ . Distinct roles for IL-2 and IL-15 are also suggested from experiments in knock-out mice. Whereas IL-2 $^{-/-}$ and IL-2R $\alpha^{-/-}$ mice develop exacerbated T and B cell expansion associated with autoimmune manifestations, IL-15 $^{-/-}$ and IL-15R $\alpha^{-/-}$ mice on the contrary have normal T and B cell populations and display a profound defect in NK cells, NK-T cells, intraepithelial lymphocytes, and CD8 $^{+}$ memory T cells (19, 20). A recent study suggests that, contrary to the results obtained *in vitro*, the major role of IL-2 *in vivo* is to limit continuous expansion of activated T cells, whereas IL-15 is critical for initiating T cell division (21).

A number of studies have contributed to the identification of human disorders in which targeting the IL-15 system is of clinical relevance and potential benefit. Among them are autoimmune and inflammatory diseases, infectious diseases, transplant rejection, cancer, and immunodeficiencies (22, 23). In this context, the rational design of agonists or antagonists of the IL-15/receptor system is a major concern and requires precise knowledge of the structure of the high affinity IL-15 receptor complex.

A number of mutagenesis studies of human and murine IL-2 have led to the identification of several residues implicated in the binding to the IL-2R α , β , and γ chains. From these studies, residues Lys-35, Arg-38, Phe-42, and Lys-43, all located in the A-B loop of human IL-2, are involved in its binding to the IL-2R α chain, whereas residues Asp-20 on helix A and Asn-88 on helix C are involved in the binding to the IL-2R β chain, and Gln-126 on helix D is crucial for binding to the IL-2R γ chain (24–26). Similar regions were identified on mouse IL-2 (27). On the contrary, very little data are available concerning the residues on IL-15 involved in the binding to the different IL-15 receptors. Some mutations in human IL-15 (Asp-8 and Gln-108), which are analogous to the ones described for human IL-2, suggested that the corresponding regions in IL-15 are involved in the binding to the IL-2R β and γ subunits, respectively (28).

In this study, we have used different complementary approaches, including ligand receptor interaction analysis, induction of biological activity, antibody mapping, peptide scanning, site-directed mutagenesis, and molecular modeling, to define the epitope of IL-15 responsible for high affinity binding to the IL-15R α chain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cytokines and Antibodies—Recombinant murine IL-3 and human GM-CSF were purchased from R & D Systems (Abington, UK); recombinant human IL-15 (rIL-15) was purchased from PeproTech Inc (Rocky Hill, NJ), and recombinant human IL-2 (rIL-2) was purchased from Chiron (Emeryville, CA). Polyclonal goat anti-human IL-2 AF-202-NA was purchased from R & D Systems, and the mouse anti-human IL-2 mAb IL2.66 was from Immunotech (Marseille, France). Monoclonal mouse anti-human IL-15 MAB247 was obtained from R & D Systems, and mouse anti-human IL-15 mAb M111 was from Genzyme (Cambridge, MA). Monoclonal mouse anti-human IL-15R α M161 was kindly provided by GenMab A/S (Copenhagen, Denmark), and mouse anti-FLAG mAb M2 conjugated to peroxidase was purchased from Sigma.

Cell Culture—All cells were grown in 5% CO $_2$ at 37 °C in a water-saturated atmosphere. The non-adherent TF-1 human cell line, TF-1 β human cells (29) (kindly provided by Dr. Bruno Azzarone, IGR, Villejuif, France), and the adherent Chinese hamster ovary DUCKX cell line were cultured in a RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, and specific reactants as follow: 1 ng/ml of GM-CSF (TF1); 1 ng/ml GM-CSF and 250 μ g/ml geneticin (TF-1 β); and 10 μ g/ml adenosine, deoxyadenosine, and thymidine (DHFR $^{-/-}$ Chinese hamster ovary DUCKX). The non-adherent CTLL-2 murine cell line was cultured in a RPMI 1640 medium containing 8% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 15 ng/ml rIL-2, and 50 μ M 2-mercaptoethanol. Adherent 293-EBNA human cells (Invitrogen) were

cultured in a Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 1 mg/ml glucose, and 250 μ g/ml geneticin.

Production of Anti-IL-15 Monoclonal Antibodies and Fab Fragments—The anti-IL-15 mAbs were produced following the immunization of BALB/c mice with recombinant human IL-15 (Diacione, Besançon, France). Spleen cells were fused to the X6.3/AG.8653 myeloma according to conventional protocols. Hybridoma cloning was performed by limiting dilution, and the IgG-secreting clones were screened by ELISA on recombinant IL-15-coated wells for specific production of anti-IL-15 antibodies. Among the anti-IL-15 mAbs obtained, five were selected (B-T15, B-S19, B-P21, B-N22, and B-E29) that were all of the IgG1 isotype. They were produced in ascitic fluid and purified by ion exchange chromatography.

Fab fragments of anti-IL-15 B-E29 mAb were obtained by digestion with papain. B-E29 mAb was incubated for 2 h at 37 °C in phosphate-buffered saline with 20 mM cysteine, 20 mM EDTA, and 10 μ g of papain/mg mAb. Iodoacetamide (75 mM final concentration) was added, and the reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min. The Fab fragments were purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-75 column).

Preparation of Soluble IL-15R α -IL-2 Fusion Protein—To generate the chimeric soluble IL-15R α -IL-2 construct, the signal peptide and the extracellular domain of IL-15R α (nucleotides 1–697) were PCR-amplified from pN15R (30), using the sense primer 5'-GGGAAGCTTACGTC-CAGCGGTGTCTTGT-3' (primer 1, nested HindIII restriction site underlined) and the antisense primer 5'-AACTGCAGAGTGGTGTCTGCT-GTGGCC-3' (primer 2, PstI underlined). The amplified coding sequence was then cloned into a pBluescript plasmid coding for human IL-2 (31). In the final hybrid gene, the PstI site (coding for the dipeptide Leu-Gln) behaved as a linker between the IL-15R α (5' end) and IL-2 (3' end) sequences. The sequence was controlled, and the chimeric construct was digested from the pBluescript plasmid between the HindIII/NotI sites and subcloned into the mammalian expression vector pKCR6 (32) at the EcoRI site. DHFR $^{-/-}$ Chinese hamster ovary cells were transfected with pKCR6-sIL-15R α -IL-2 using SuperFect Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France). Clones producing the fusion protein were detected using an ELISA for detection of human IL-2 (BioSource, Nivelles, Belgium). Three rounds of cloning were performed using increasing concentrations of methotrexate (Sigma). One clone selected at 5 μ M methotrexate produced about 4.3 mg/liter sIL-15R α -IL-2. The supernatants were concentrated by precipitation with ammonium sulfate at 60% saturation and loaded onto an IL-2 immunoaffinity column (mAb IL2.66), and the IL-2 fusion protein was purified as described (31). Its concentration was determined by ELISA for human IL-2. Its purity was at least 80% with a molecular mass of 60 kDa, as assessed by SDS-PAGE after iodination with a chloramine-T method as described previously (12). Full functionality of the IL-2 portion of the fusion protein was demonstrated in a CTLL-2 proliferation assay (cell proliferation kit II, Roche Diagnostics), using rIL-2 as standard. High affinity IL-15 binding of the IL-15R α portion was demonstrated by using the surface plasmon resonance technology (Biacore AB, Uppsala, Sweden).²

Production of IL-15 Mutants—The pEF-neo PPL signal peptide-IL-15 (human) expression construct was kindly provided by Dr. Yutaka Tagaya (33). The FLAG tag (DYKDDDDK) was introduced at the MluI site between the PPL signal peptide and the mature IL-15 protein coding sequence as a double-stranded oligonucleotide (5'-CGCGAGACTACA-AGGATGACGATGACAAGT-3' and 5'-CGCGACTTGTCTGTCATCCTGTGTAGTCT-3'). A pBluescript plasmid containing the PPL-FLAG-IL-15 sequence was generated by subcloning the ClaI/BamHI fragment. Amino acid switching was performed using the QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) with the pBluescript construct. Sequences were confirmed over the PPL-FLAG-IL-15 hybrid cDNA, and the mutated ClaI/BamHI fragment was cloned back into pEF-neo. For the production of a FLAG-IL-15 mutant, 3.2 $\times$ 10 6 adherent 293-EBNA cells were transfected with 16 μ g of the mutated IL-15 expression construct in a 60-mm plate following a standard calcium phosphate protocol. After 6 h, the medium was replaced with fresh complete Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen), and supernatants were harvested 48 h after transfection. The concentration of wild-type FLAG-IL-15 was determined in an RIA with the anti-IL-15 MAB247 as the coating antibody and iodinated anti-IL-15 mAb B-E29 as the revealing antibody, using commercial rIL-15 as standard. B-E29 mAb was radiolabeled with [125 I]iodine and IODO-GEN (Pierce) as catalyst (34), at a specific radioactivity of around 2000 cpm/fmol. The concentrations of FLAG-IL-15 mutants were then determined in an

² J. Bernard, unpublished results.

ELISA with MAB247 as the coating antibody and peroxidase-conjugated anti-FLAG M2 mAb as the revealing antibody, using wild-type FLAG-IL-15 as standard. The mutants were also tested in the RIA.

Peptscan Analysis—The overlapping synthetic peptides were synthesized and screened using credit card format mini-PEPSCAN cards (455 peptide format/card) as described previously (35). The binding of antibodies to each peptide was tested in a PEPSCAN-based ELISA. The 455-well credit card format polyethylene cards, containing the covalently linked peptides, were incubated at 4 °C overnight with the samples (mouse monoclonal anti-IL-15 antibody or soluble IL-15R α -IL-2 fusion protein) diluted in blocking solution containing 5% horse serum (v/v) and 5% ovalbumin (w/v). After washing, the cards were incubated (1 h, 25 °C) with peroxidase-coupled rabbit anti-mouse IgGs at 1.3 μ g/ml (P 0260, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) for anti-IL-15 antibody detection. For sIL-15R α -IL-2 or rIL-2 detection, the cards were incubated with the anti-human IL-2 antibody AF-202-NA (1 μ g/ml), washed, and further incubated with peroxidase-coupled rabbit anti-goat IgGs at 1.3 μ g/ml (P 0160, Dako Cytomation). After washing, the peroxidase substrate 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate plus 2 μ l/ml of 3% H₂O₂ were added, and the color development was quantified at 1 h, using a CCD camera and an image processing system. The set up consists of a CCD camera and a 55-mm lens (Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikkor 55-mm f/2.8 lens), a camera adaptor (Sony Camara adaptor DC-77RR), and the Image Processing software package Optimas, version 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), run on a Pentium II computer system. The CCD camera is equipped with an orange filter that translates the green color of the 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate substrate into gray values (arbitrary scale).

IL-15 Binding Assays—Human rIL-15 was radiolabeled with [¹²⁵I]iodine (specific radioactivity of around 2000 cpm/fmol) using a chloramine-T method (36), and binding experiments were performed as described previously (12). Nonspecific binding was determined in the presence of 100-fold excess of unlabeled cytokine. For the IL-15 binding experiments, TF-1 cells were incubated with increasing concentrations of labeled rIL-15. Regression analysis of the binding data was accomplished using a one-site equilibrium binding equation (Grafitt, Erithacus Software, Staines, UK), and data were plotted in the Scatchard coordinate system. For inhibition of IL-15 binding experiments, TF-1 cells were incubated with a fixed concentration of iodinated rIL-15 and increasing concentrations of FLAG-IL-15 or mutants or mAbs. Regression analysis of data was accomplished using a 4-parameter logistic equation (Grafitt, Erithacus Software).

Proliferation Assays—The proliferative inducing activity of FLAG-IL-15 and mutants and the inhibitory activity of mAbs were assessed by [³H]thymidine incorporation on TF-1 β cells. Cells were maintained in the culture medium for 3 days, washed twice, and starved for 2 h in the same medium without cytokine. They were plated at 10⁴ cells in 100 μ l and cultured for 48 h in the medium supplemented with increasing concentrations of rIL-15, FLAG-IL-15, or mutant or in the medium supplemented with a fixed concentration of rIL-15 and increasing concentration of mAbs. Cells were pulsed for 16 h with 0.5 μ Ci/well of [³H]thymidine and harvested onto glass fiber filters, and cell-associated radioactivity was measured.

Sequence Alignment and Molecular Modeling—Sequences were obtained from the Swiss-Prot data base. Secondary structure prediction of human IL-15 was performed with PHD server (cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/submit_def.html). Sequence alignment with human IL-2 was generated automatically with the ClustalW program (37) and optimized manually under Seaview (38) according to conserved amino acids and predicted α -helical structure.

Homology modeling was performed with the Modeler module of InsightII (39) using the x-ray crystallographic structure of human IL-2 (Protein Data Bank code 1M47) as a template and the selected sequence alignment. Evaluation of the generated models was done by the Profiles_3D module of InsightII (40), Prosa II program (41), and PROCHECK program (42). The protein molecular surface of the selected model was defined using a solvent probe radius of 1.4 Å. The Engelman-Steitz scale was used to display the protein surface hydrophobicity (43).

RESULTS

Functional Properties of Anti-IL-15 mAbs—Seven anti-IL-15 mAbs were tested for interference with iodinated rIL-15 binding to IL-15R α . The TF-1 cell line was chosen because it expresses cell-surface IL-15R α and IL-2R γ but not IL-2R β and, contrary to TF-1 cells transfected with IL-2R β (TF-1 β), does not proliferate in response to IL-15. This cell line is therefore

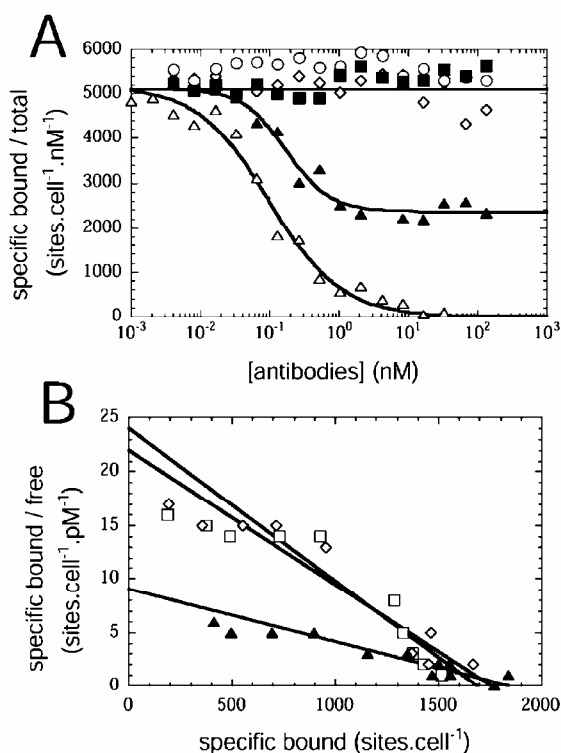


FIG. 1. Effects of anti-IL-15 and anti-IL-15R α mAbs on IL-15 binding to TF-1 cells. A, TF-1 cells were equilibrated with a fixed concentration of radiolabeled rIL-15 (80 pM) and increasing concentrations (as indicated on the abscissa) of the following mAbs: anti-IL-15R α mAb M161 (Δ), anti-IL-15 mAbs B-T15 ($\diamond$), B-E29 ($\blacktriangle$), MAB247 ($\circ$), or M111 ($\blacksquare$). The nonspecific cell binding component was determined in the presence of radiolabeled rIL-15 (80 pM) and a 100-fold excess (8 nM) of unlabeled rIL-15. Cell-bound and unbound (free) fractions were measured, and the specific bound fraction was calculated by subtracting the nonspecific binding from the cell-bound fraction. On the ordinate is plotted the ratio of the specific bound fraction (expressed in sites.cell⁻¹) over the total concentration (bound plus free) of radiolabeled rIL-15 (expressed in nM). B, TF-1 cells were equilibrated with increasing amounts of [¹²⁵I]-labeled rIL-15 in the absence ($\square$) or presence of 40 nM of B-T15 ($\diamond$) or B-E29 ($\blacktriangle$) mAbs. The specific bound and unbound (free) fractions were determined as above.

likely to express isolated membrane-associated IL-15R α in the absence of IL-2R β / γ recruitment. TF-1 cells bound IL-15 with high affinity (K_d = 79 pM) (Fig. 1B), and the binding was completely abrogated by the anti-IL-15R α mAb M161 (IC_{50} = 100 pM) (Fig. 1A), indicating that the binding indeed reflected the formation of an IL-15-IL-15R α complex. Cross-linking studies have also shown the association of IL-15 with a single band corresponding to IL-15R α .³

Among the seven anti-IL-15 antibodies tested, only B-E29 inhibited IL-15 binding to this cell line. When tested on a fixed concentration of iodinated rIL-15 (Fig. 1A), the effect of B-E29 was dose-dependent, with an IC_{50} of 172 pM, and partial, with about 50% of IL-15 binding being resistant to the inhibitory effect of the antibody. In contrast, mAbs B-T15, MAB247, and M111 (shown in Fig. 1A), as well as mAbs B-S19, B-P21, and B-N22 (not shown), were without effect.

The partial inhibitory effect of B-E29 could reflect heterogeneity in IL-15R α expressed by TF-1 cells, in that a fraction of receptors would bind IL-15 in a way sensitive to the inhibitory

³ E. Mortier, unpublished results.

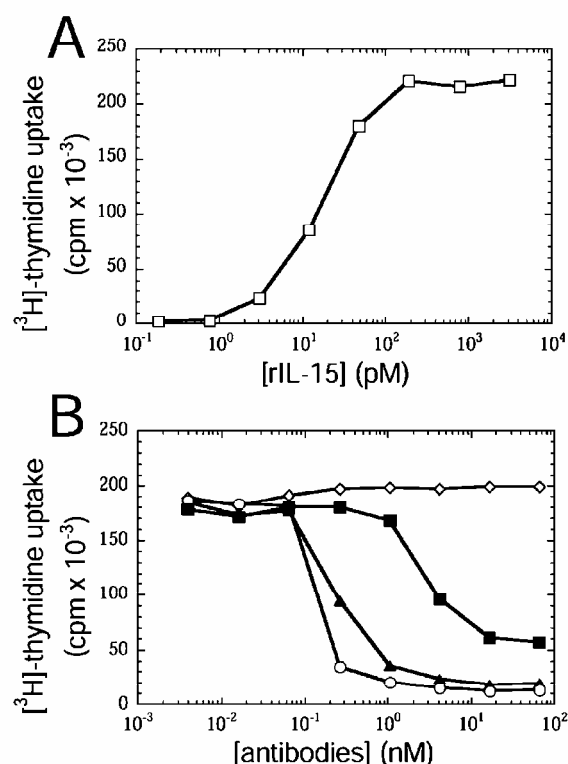


FIG. 2. Effect of anti-IL-15 mAbs on IL-15-induced proliferation of TF-1 β cells. Cell proliferation was evaluated by measuring the incorporation of [³H]thymidine. *A*, cells were cultured with increasing concentrations (as indicated on the *abscissa*) of rIL-15. *B*, cells were cultured with a fixed concentration of rIL-15 (200 pM) and increasing concentrations (as indicated on the *abscissa*) of anti-IL-15 mAbs: B-T15 (◇), B-E29 (▲), MAB247 (○), or M111 (■).

effect of the antibody, whereas the other fraction would not. Another possibility would be that B-E29 reduces the binding affinity of IL-15. To decide between these alternatives, B-E29 was tested at a saturating concentration (40 nM) on the IL-15 binding curve (Fig. 1*B*). Scatchard analysis of the binding curves showed that B-E29, contrary to B-T15, induced a homogeneous reduction of the affinity of IL-15 ($K_d = 209$ pM *versus* 79 pM in the absence of antibody). Similar results were obtained with Fab fragments of B-E29 (data not shown), suggesting that the effect of B-E29 did not involve cross-linking events.

The anti-IL-15 mAbs were next analyzed for their capacities to interfere with IL-15 induction of proliferation of the IL-15 dependent human TF-1 β that expresses endogenous human IL-15R α and IL-2R γ together with transfected human IL-2R β (Fig. 2). As shown in Fig. 2*A*, this cell line dose-dependently responded to picomolar concentrations of IL-15, with an EC_{50} of 20 pM, reflecting the activation of high affinity IL-15R α /IL-2R β / γ receptors. Among the series of seven anti-IL-15 antibodies tested, only B-E29, MAB247, and M111 were found to neutralize the effects of IL-15 on this cell line (Fig. 2*B*). The three mAbs induced dose-dependent inhibitory effects with IC_{50} values of 0.3, 0.13, and 4 nM, respectively, and the inhibitory effects of B-E29 and MAB247 were almost complete. The IC_{50} of B-E29 (0.3 nM) was in agreement with its inhibitory effect on IL-15 binding to TF-1 cells ($IC_{50} = 0.172$ nM).

Epitope Mapping of the Anti-IL-15 mAbs Using a Pepscan Technology—In a first attempt to identify the epitopes recognized by the anti-IL-15 mAbs, they were tested for their reac-

tivity with IL-15 peptides using a peptide scanning technology. A series of 12-mer overlapping peptides shifted from one to the next by one amino acid and covering the entire sequence of human IL-15 (shown in Fig. 3*B*) were synthesized on a solid phase and assayed for anti-IL-15 mAb binding by using a two-step ELISA as described under "Experimental Procedures." With the inhibitory B-E29 antibody, a clear peak of reactivity was observed (Fig. 3*A*) that corresponded to the recognition of the peptide sequence ⁶¹DTVENLIILANN⁷², a peptide belonging to the predicted C-helix of IL-15 (Fig. 3*B*). A control experiment using the secondary anti-mouse antibody in the absence of B-E29 gave background reactivity (not shown). Given the inhibitory effects of B-E29, this peptidic sequence is therefore very likely to be involved in the binding of IL-15 to the IL-15R α chain.

The reactivity of MAB247 was also analyzed by pepscan. Although a higher background was noted, a major peak of reactivity was found with IL-15 peptides covering the C-terminal part (¹⁰²SFVHVIVQMFIN¹¹²) and corresponding to the end of the D-helix (Fig. 3*B*). Insofar as MAB247 did not inhibit IL-15 binding to the IL-15R α chain, the C-terminal part of IL-15 is therefore not implicated in this binding event. However, given the properties of MAB247 (inhibition of IL-15 induced proliferation without effect on IL-15 binding to IL-15R α), this C-terminal helix is likely to participate in the recruitment of the transducing IL-2R β / γ complex. The M111 mAb that displayed similar functional features as MAB247 (no inhibition of IL-15 binding and inhibition of proliferation) was also found to cross-compete with MAB247 for binding to IL-15 (not shown), suggesting that these two antibodies recognize a common epitope. However, M111 did not show any reactivity in the pepscan studies, a result that could be due to the fact that M111 has a 5-fold lower affinity for IL-15 than MAB247 (not shown).

The anti-IL-15 mAbs B-T15 and B-P21 (Fig. 3*A*) gave strong peaks of reactivity located in the same region of IL-15. The anti-IL-15 mAb B-N22 gave a pattern very similar to that of B-T15 (not shown), and mAb B-S19 gave a pattern very similar to that of B-P21 (not shown). These four non-neutralizing antibodies therefore reacted with a region of IL-15 different from that recognized by B-E29 or MAB247. This region corresponded to the peptide sequence ⁸⁵CKECEELEKN⁹⁶ that is located in the loop between the predicted C and D helices (Fig. 3*B*). Therefore, this C-D loop is not likely to be involved in the binding and recruitment by IL-15 of IL-15 receptor components.

Analysis of IL-15R α Binding to IL-15 by a Pepscan Approach—The pepscan approach was further used in an attempt to identify IL-15 regions directly involved in IL-15R α binding. For that purpose, a soluble fusion protein (sIL-15R α -IL-2) consisting of the extracellular domain of human IL-15R α fused to human IL-2 was assayed for binding to the 12-mer IL-15 peptides, using a polyclonal anti-human IL-2 antibody (AF-202-NA) as the revealing antibody (Fig. 3*A*). Two main peaks of reactivity were observed that corresponded to the binding of sIL-15R α -IL-2 with two different regions of the IL-15 sequence. Control experiments with a similar concentration (330 nM) of rIL-2 gave background reactivity (Fig. 3*A*). Pepscan studies on 30-mer peptides of human IL-15 confirmed the reactivity of sIL-15R α -IL-2 with these two IL-15 regions (data not shown). Analysis of the two sets of reactive peptides (12-mer and 30-mer) allowed to assign the following sequences as responsible for sIL-15R α -IL-2 binding: ⁴⁴LLELQVISL⁵³ (peptide 1) and ⁶⁴ENLII⁶⁸ (peptide 2). The first sequence is located within helix B (Fig. 3*B*). The second sequence, located in helix C, is completely contained in the one recognized by the mAb B-E29, a

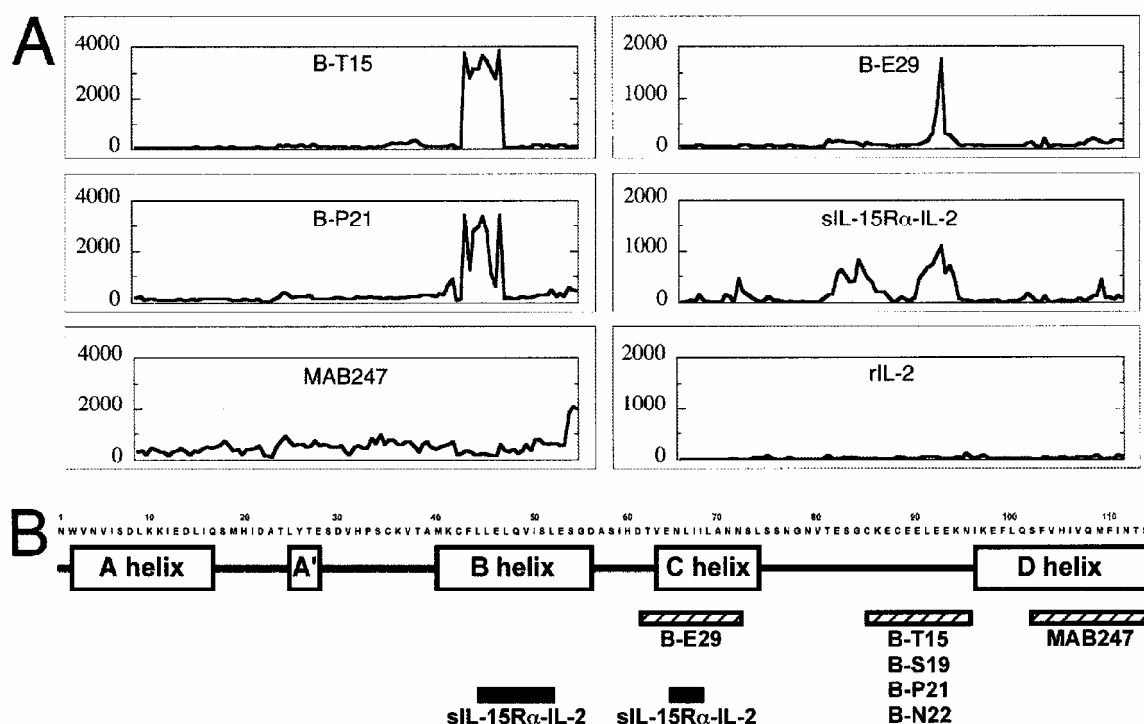


FIG. 3. Analysis of the binding of anti-IL-15 mAbs and sIL-15R α -IL-2 to IL-15 12-mer peptides. A, 12-mer peptides spanning the entire amino acid sequence of human IL-15 were immobilized in multiwell plates and tested for their reactivity with the different molecules as indicated. The left side of each sub-panel corresponds to the N-terminal 12-mer peptide of IL-15. The anti-IL-15 mAbs were incubated at 10 μ g/ml (B-P21 and B-E29; B-S19, B-N22, M111; not shown) or 1 μ g/ml (MAB247 and B-T15), and their binding was revealed with peroxidase-coupled rabbit anti-mouse IgG. The sIL-15R α -IL-2 fusion protein (20 μ g/ml, i.e. 330 nM) or rIL-2 (5 μ g/ml, i.e. 330 nM) was incubated, and their binding was revealed with the goat AF-202-NA anti-human IL-2 antibody plus a peroxidase-coupled rabbit anti-goat IgG. The reactivity of each well (ordinates, arbitrary scale) is measured as described under "Experimental Procedures." B, the peptide regions of human IL-15 recognized by the anti-IL-15 mAbs and sIL-15R α -IL-2 are positioned on the primary structure of IL-15. The four α -helices predicted from our molecular model (see "Experimental Procedures" and Fig. 6A) are shown.

result that fits with and can explain the inhibitory potency of the antibody on IL-15 binding.

IL-15 Site-directed Mutagenesis—In order to confirm the involvement of the two peptidic regions identified by pepscan in the binding to the IL-15R α chain, point mutations of IL-15 in these regions were carried out. In order to introduce a substantial disturbance in the presumed receptor-binding site, non-polar hydrophobic side chains (Leu, Val, and Ile) and non-charged polar side chains (Ser, Gln, and Asn) were replaced by charged groups (Asp, Glu, or Lys), and charged polar side chains (Glu) were replaced by oppositely charged groups (Lys). Mutants were generated at positions 44–52 (peptide 1) and positions 64–68 (peptide 2). Wild-type human IL-15 and mutants were expressed as fusion proteins with an N-terminal FLAG peptide in the 293-EBNA cells. In order to determine their concentrations in 293-EBNA cell supernatants, specific assays were set up (see "Experimental Procedures" and below).

FLAG-IL-15 and mutants expressed in 293-EBNA cell supernatants were first assayed for their reactivities with anti-IL-15 mAbs (data not shown). Two assays were set up. The first one was a sandwich ELISA using MAB247 as capture antibody and peroxidase-labeled anti-FLAG (M2) mAb as sensor. The second was a sandwich RIA in which MAB247 was used as capture antibody and radioiodinated mAb B-E29 as sensor (see details under "Experimental Procedures"). FLAG-IL-15 and mutants were all recognized in the ELISA, in agreement with our finding under pepscan that MAB247 reacted with a region of IL-15

distinct from peptides 1 and 2. FLAG-IL-15 and most mutants in the peptide 1 region showed similar reactivities in the ELISA and RIA, indicating that they are similarly recognized by iodinated B-E29 mAb. By contrast, none of the FLAG-IL-15 analogs mutated in the peptide 2 region reacted in the RIA, a result that confirms the involvement of peptide 2 in the B-E29 binding epitope.

FLAG-IL-15 and mutants were then assayed for their ability to bind IL-15R α expressed by TF-1 cells. For that purpose, a competition assay was used that allowed us to compare the efficiencies of the different mutants to inhibit the binding of a low, non-saturating concentration of radioiodinated rIL-15 to TF-1 cells. The competition curves are shown in Fig. 4, and the concentrations of mutants giving half-maximal inhibitory effects (IC₅₀ values) are listed in Table I. FLAG-IL-15 inhibited labeled rIL-15 binding with an IC₅₀ of 26 pM, a value in agreement with the equilibrium dissociation constant reflecting the binding of labeled rIL-15 to the same cells (K_d = 79 pM, Fig. 2B). This finding supports the validity of the competition assay to estimate the affinities of the different mutants. Mutations at three positions (Glu-46, Val-49, and Ile-50) within peptide 1 had profound effects on the affinity of IL-15, whereas mutation Q48K was without effect. Mutations at position Leu-45 (L45D and L45E), Ser-51, and Leu-52 reproducibly resulted in an increased (2–3-fold) affinity of IL-15 in this competition assay. The mutants L44D and L47D could not be evaluated in this assay because of production levels that were too low in 293-

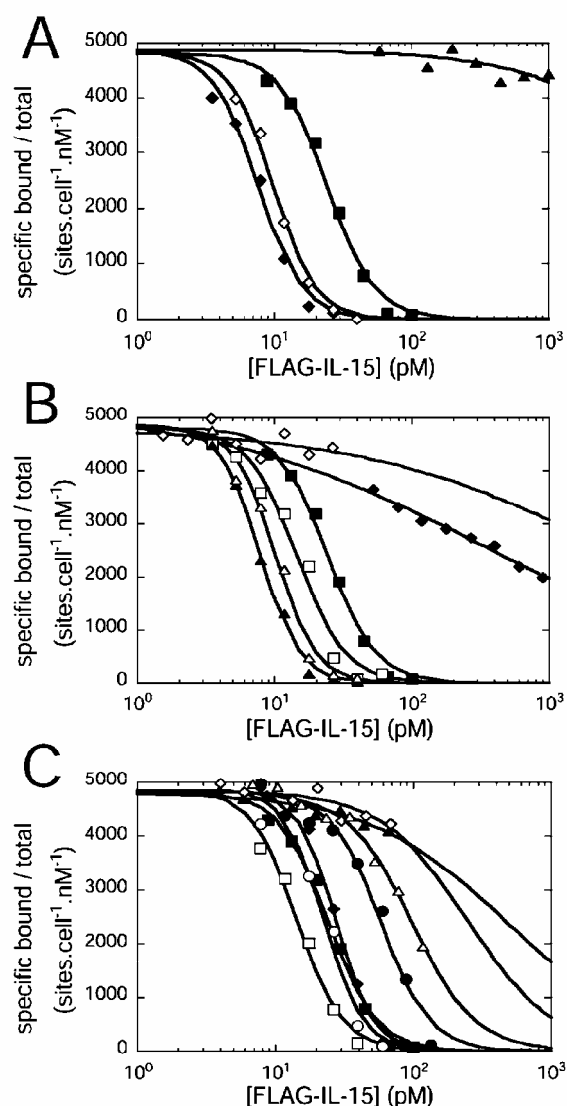


FIG. 4. Determination of the affinities of FLAG-IL-15 and mutants for IL-15R α by competition binding studies. TF-1 cells were equilibrated with a fixed concentration (80 pM) of 125 I-rIL-15 and increasing concentrations (as indicated on the *abscissa*) of the FLAG-IL-15 wild type (WT) or mutants. A, WT (■), L45D (◆), L45E (◇), and E46K (▲). B, WT (■), Q48K (□), V49D (◆), I50D (◇), S51D (▲), and L52D (△). C, WT (■), E64K (□), N65K (◆), L66D (◇), L66E (▲), I67D (△), I67E (●), and I68D (○). Specific rIL-15 cell binding was calculated and plotted as described in the legend of Fig. 1B.

EBNA supernatants. Some mutations in the peptide 2 region (those directed to residues Leu-66 and Ile-67) also strongly reduced the affinity of IL-15, whereas mutations at positions Glu-64, Asn-65, and Ile-68 were without significant effects.

Wild-type FLAG-IL-15 and mutants were then tested for their growth-promoting effects on the IL-15-responsive TF-1 β cells (Fig. 5 and Table II). The peptide 1 mutants displayed biological activities that correlated well with their IL-15R α binding efficiencies measured on TF-1 cells; the L44D, E46K, L47D, and I50D mutations resulted in a strong reduction of the biological activity of IL-15, whereas mutation Q48K was without significant effect, and mutations at posi-

TABLE I

Binding properties of the IL-15 mutants on the TF-1 cell line
Mean $\pm$ S.D. of the relative activities are from three independent experiments. ND, not determined; NA, not applicable.

FLAG-IL-15 proteins	IC ₅₀	Relative activity
	pM	% WT
WT	26.1	100
L44D	ND	NA
L45D	10.1	258 $\pm$ 30
L45E	12.5	209 $\pm$ 10
E46K	13314.7	0.20 $\pm$ 0.01
L47D	ND	NA
Q48K	20.5	127 $\pm$ 27
V49D	347.7	8 $\pm$ 2
I50D	2949.8	0.88 $\pm$ 0.45
S51D	11.6	225 $\pm$ 36
L52D	10.9	239 $\pm$ 5
E64K	18.2	143 $\pm$ 43
N65K	26.6	98 $\pm$ 26
L66D	190.9	14 $\pm$ 8
L66E	407.1	6 $\pm$ 2
I67D	104.8	25 $\pm$ 6
I67E	63.7	41 $\pm$ 9
I68D	20.2	129 $\pm$ 28

tions Leu-45, Ser-51, and Leu-52 induced a 2–4-fold increase in bio-activity. The only exception was mutant V49D which, despite a strongly reduced binding capacity, displayed nearly wild-type bio-activity.

In contrast, the correlation between biological activity on TF-1 β cells and binding affinity on TF-1 cells was far weaker with mutants in the peptide 2 region. Mutant N65K, which displayed a nearly wild-type binding affinity on TF-1 cells, was inactive on TF-1 β cells. Mutants E64K and I68D, which also displayed nearly wild-type binding affinities, behaved as partial agonists on TF-1 β with maximal responses being about 20% that of wild-type IL-15. The only correlation was found for mutations at the Leu-66 and Ile-67 positions. The mutants L66D, L66E, I67D, and I67E displayed reduced bio-activity with a ranked order of potencies similar to that seen in the competition binding assay.

Molecular Modeling—The final alignment of IL-15 sequence to that of IL-2 is shown on Fig. 6A. Based on this alignment, the two cytokines share a 21.93% sequence identity. IL-15 sequence contains two disulfide bonds at positions Cys-42 to Cys-85 and Cys-35 to Cys-88, the former being homologous to the Cys–Cys within IL-2. The sequence alignment reveals conserved residues especially in helical structure supporting the structural homology of the two cytokines: DLXXIXXXI (X representing a non-conserved residue), CXXXEL, LIXXXN, and EFLXXXXXXXXQXXI in the A–D-helices, respectively. Two conserved residues (Asp-20 and Gln-126 of the IL-2 sequence) known to be involved in IL-2R β and IL-2R γ binding, respectively, suggest similar interactions with those receptor subunits (44).

With this alignment, and based on the x-ray structure of human IL-2, three-dimensional models of human IL-15 were generated by Modeler program and tested for their accuracy using the three-dimensional-one-dimensional profile method (45), which calculates the local compatibility between a residue and its structural environment. The model given the best global score ($S = 38.1$) was retained. This score is close to that obtained for the template ($S = 43.63$) and is in agreement with a compilation of values obtained for correctly folded proteins of the same length (40). Two successive refinements were performed around two slim and weak mis-folded regions. The orientation of the side chains was then optimized with SC-WRL3 program (46) using a backbone-dependent rotamer library. Energy minimization was then carried out with

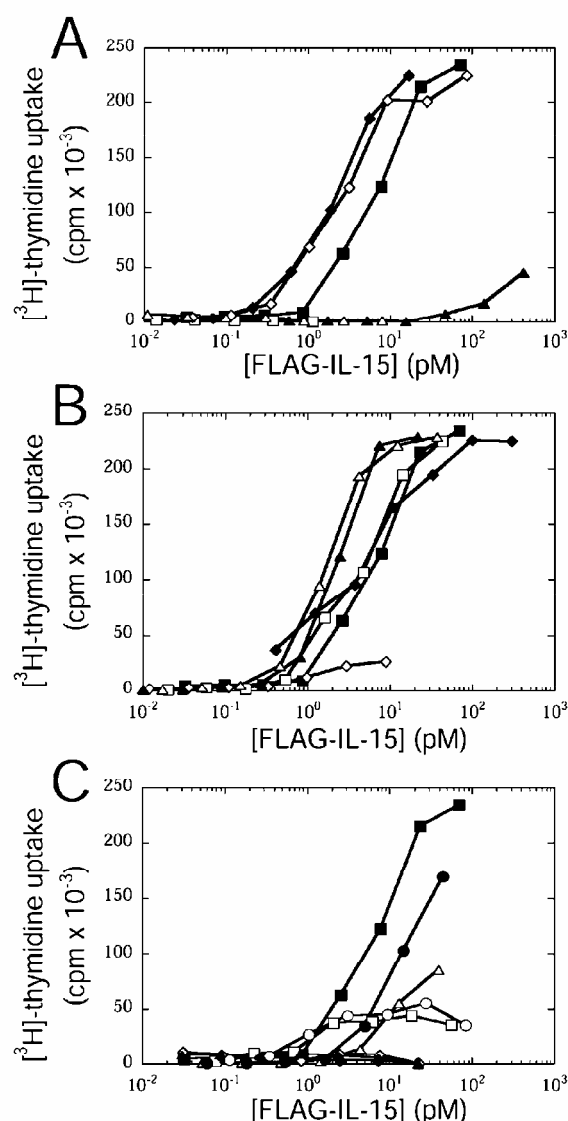


FIG. 5. Proliferative activities of FLAG-IL-15 and mutants on TF-1 β cells. TF-1 β cells were cultured in the presence of increasing concentrations (as indicated on the *abscissa*) of FLAG-IL-15 wild type (WT) or mutants. A, WT (■), L44D (□), L45D (◆), L45E (◇), E46K (▲), and L47D (△). B, WT (■), Q48K (□), V49D (◆), I50D (◇), S51D (▲), and L52D (△). C, WT (■), E64K (□), N65K (◆), L66D (◇), L66E (▲), I67D (△), I67E (●), and I68D (○). Cell proliferation was evaluated by measuring the incorporation of [3 H]thymidine.

CHARMM module (47) of Insight II and CFF force field (48), using Steepest Descents and adopted basis Newton-Raphson methods and a fixed backbone. A definitive evaluation of the optimized model was done using Profile three-dimensional ProsaII and PROCHECK. The three-dimensional profile plots were always larger than zero, indicating that most residues lie in a correct environment, and gave a global compatibility score of 40.2. The energy scores given by ProsaII were in accordance with those of the template. Furthermore, the stereochemical quality of the selected predicted model as evaluated by PROCHECK compares favorably with the template; the Ramachandran plot showed 89.8% residues in most favored regions, 7.4%

TABLE II
Proliferative activities of the IL-15 mutants on TF-1 β cells
Mean $\pm$ S.D. of the relative activities are from three independent experiments. NA, not applicable.

FLAG-IL-15 Proteins	Maximal induction	EC ₅₀	Relative activity
	% WT	μ M	% WT
WT	100	6.0	100
L44D	0	>20.0	<30
L45D	100	1.7	353 $\pm$ 73
L45E	100	2.4	250 $\pm$ 21
E46K	>20	>1300.0	<0.5
L47D	0	>60.0	<10
Q48K	100	4.8	125 $\pm$ 22
V49D	100	6.2	97 $\pm$ 55
I50D	>10	>60.0	<10
S51D	100	1.9	316 $\pm$ 26
L52D	100	1.7	353 $\pm$ 91
E64K	20	$\approx$ 0.8	NA
N65K	0	>200.0	<0.4
L66D	0	>200.0	<0.4
L66E	0	>200.0	<0.4
I67D	>40	>30.0	<3
I67E	>75	>10.0	<8
I68D	20	$\approx$ 0.8	NA

in additional allowed regions, and 2.8% in generously allowed regions. A ribbon representation of the final model is shown in Fig. 6B, where peptide 1 and peptide 2 residue side chains are displayed. Because of the folding of the protein, helices B and C of IL-15 appear to be in close proximity. On Fig. 6C a Connolly surface representation is shown demonstrating that residues from peptides 1 and 2 are exposed to solvent (except Ile-50 which is buried in the core of the molecule) and form a continuous surface area. Hydrophobicity analysis (Fig. 6D) reveals that this area is composed of a large hydrophobic cluster containing four hydrophilic amino acids (Glu-46, Gln-48, Glu-64, and Asn-65).

DISCUSSION

As opposed to the IL-2R α chain that binds IL-2 with low affinity (49), the IL-15R α chain has been shown *per se* to display high affinity binding for IL-15 (11). The interface between IL-15 and IL-15R α therefore likely contributes to most of the free energy of binding of IL-15 to its functional high affinity ($\alpha\beta\gamma$) receptor. To design proteins with agonist or antagonist properties of the IL-15 system, a good knowledge of the molecular features of the IL-15/IL-15R α interface is therefore desirable. No data are available so far on that topic, and the main aim of this study was to contribute to the definition of the epitope in IL-15 responsible for the binding of IL-15R α .

Two regions were first identified by pepscan that specifically bind a soluble form of IL-15R α . They are positioned in Fig. 6 on a model of human IL-15 that was generated based on a sequence alignment with human IL-2. The first region (44 LLELQVISL 52 , peptide 1) is located in the B-helix, and the second region (64 ENLII 68 , peptide 2) belongs to the C-helix. The involvement of peptide 2 region in receptor binding was further supported by the fact that mAb B-E29, the only mAb among those tested that inhibits IL-15 binding to the IL-15R α , reacts with a sequence (61 DTVENLILANN 72) overlapping that of peptide 2. Two other epitopes could be defined; an antigenic region (85 KECEEELEEK 95) located on the C-D loop was found to be shared by four non-inhibitory mAbs (B-T15, B-S19, B-P21, and B-N22) and is therefore not likely to be involved in receptor binding. MAB247 was found to inhibit IL-15-induced proliferation but not IL-15 binding to IL-15R α , suggesting that it interfered with IL-2R β and/or IL-2R γ recruitment. In pepscan experiments, MAB247 reacted with a sequence (102 SFVHVHQMFIN 112) located in helix D of IL-15. These find-

24320

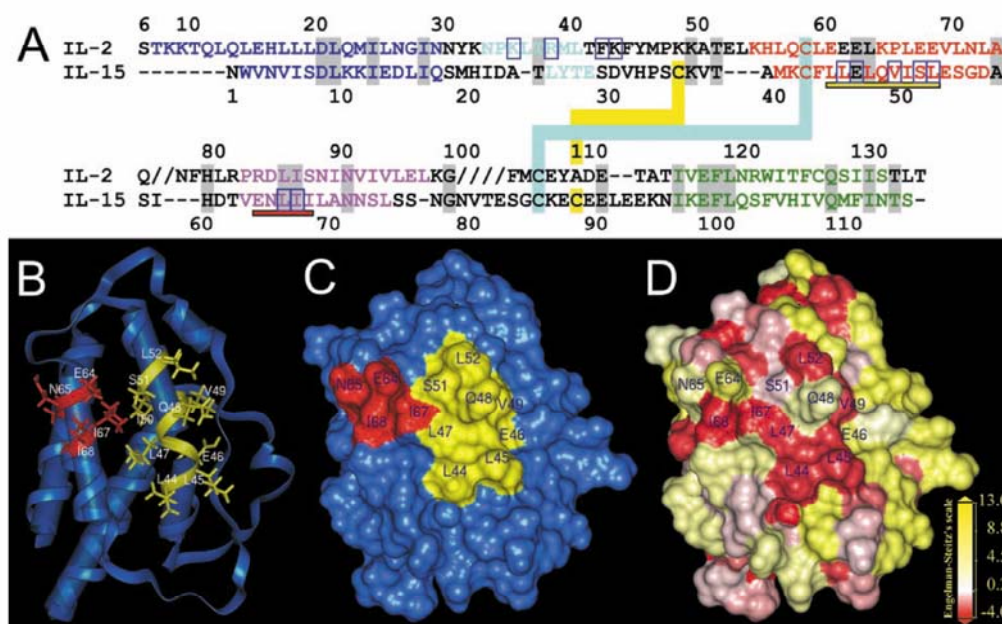
Human IL-15-binding Site for IL-15R α 

FIG. 6. Sequence alignment for human IL-15 and IL-2 and molecular model of human IL-15. A, α -helices are identified by colored letters (helix A, dark blue; A', light blue; B, red; C, pink; D, green). The disulfide bridge common to IL-2 and IL-15 is shown in blue, and the proposed disulfide bridge specific to IL-15 is shown in yellow. Conserved amino acids between IL-2 and IL-15 are shaded in gray. On the IL-2 sequence, / indicates a missing residue in the 1M47 Protein Data Bank structure. On the IL-15 sequence, residues underlined in yellow or red correspond to amino acids in peptide 1 or 2, respectively. Open blue boxes indicate human IL-2 or IL-15 residues that have been shown to participate in IL-2R α binding (25) or to be involved in the binding to IL-15R α (this paper), respectively. B, the side chains of the ribbon drawing shown in yellow or red color correspond to the residues in peptide 1 or 2, respectively. C, the Connolly surfaces of modeled IL-15 colored in yellow or red correspond to amino acids in peptide 1 or 2, respectively. D, the Connolly surfaces of modeled IL-15 are colored according to the hydrophobicity index of the exposed residues (hydrophobic in red; hydrophilic in yellow).

ings agree well with the fact that this region, particularly residue Gln-108, has been suggested to be involved in the recruitment of the IL-2R γ chain (28).

Mutagenesis studies confirmed the involvement of these two regions and enabled us to identify amino acids that participate in receptor binding and induction of bio-activity. Within the first region (peptide 1), and according to our structural model (Fig. 6C), Ile-50 is the only amino acid to be completely buried in the hydrophobic core of IL-15 and is therefore unlikely to be accessible for the receptor. Mutation at that position (I50D) strongly reduced the ability of IL-15 to bind to IL-15R α as well as to induce cell proliferation, a result that might reflect a local conformational change that affects binding and signaling. However, this conformational change seems not to disturb the overall structure of the molecule, as far as the I50D mutant was found to be recognized by MAB247 in the ELISA. Among the solvent-exposed residues in peptide 1 (Fig. 6C), Glu-46, Val-49, Leu-45, Ser-51, and Leu-52 were found to be involved in IL-15R α binding. Glu-46 was crucial, because replacement of its acidic side chain by a basic one (E46K) resulted in a complete loss of IL-15 binding to IL-15R α and bio-activity. Replacement of the hydrophobic side chain of Val-49 by a negatively charged side chain (V49D) also resulted in a strong (13-fold) reduction of the affinity of IL-15 for IL-15R α . Unexpectedly, the V49D mutant showed almost wild-type biological activity. A similar discrepancy between binding affinity and bio-activity has been reported for an IL-2 mutant (T51P) (50). This mutant was as active as wild-type IL-2, although it displayed a 10-fold lower receptor binding affinity. It has been shown that this mutant was deficient in inducing internalization of high affinity receptors, thus resulting in longer duration of receptor occupancy and induction of biological response. Whether the

V49D IL-15 analog exhibits similar properties needs further investigation.

Mutations at positions Leu-45, Ser-51, and Leu-52 did not result in reduction but to an increase in binding and bio-activity, indicating that these residues are also involved in IL-15R α binding. The mutants L44D and L47D showed impaired biological responses, although their binding affinity could not be evaluated. Unexpectedly, mutant Q48K showed almost wild-type properties, although Gln-48 is positioned in the center of an epitope formed by amino acids (Leu-45, Glu-46, Val-49, Ser-51, and Leu-52) which participate in receptor binding. Additional mutations of that residue might be required to reassess its potential involvement in receptor binding.

The results of mutagenesis in the peptide 2 region showed that among the five amino acids evaluated (Glu-64 to Ile-68), only Leu-66 and Ile-67, which are partially solvent-exposed (Fig. 6C), seem to be involved in receptor binding. The mutants (L66D, L66E, I67D, and I67E) displayed reduced binding affinities and corresponding reductions of their biological activities. Mutants E64K and I68D had affinities similar to that of wild-type IL-15, suggesting that Glu-64 and Ile-68 are not involved in IL-15R α binding. However, the mutants behaved as partial agonists in the proliferation assay. Because partial agonism is indicative of defective activation of the receptor (51), Glu-64 and Ile-68 might be involved in the recruitment of the IL-2R β/γ transduction complex. This conclusion might hold for Asn-65 whose mutation (N65K) resulted in a loss of bio-activity without detectable alteration of the IL-15R α binding affinity. Mutagenesis of mouse IL-2 and molecular modeling studies (27, 52) has indicated that, in addition to residue Asp-20 located on helix A (24), the C-helix of human IL-2 is also potentially involved in its interaction with IL-2R β , and recent work has

Human IL-15-binding Site for IL-15R α

24321

shown that a mutation in that helix (N88R) resulted in a drastic (1000-fold) loss of IL-2 binding to IL-2R β (26). Our results suggest that the corresponding regions in human IL-15, especially residues Glu-64, Asn-65, and Ile-68, participate also in the recruitment of the IL-2R β chain.

The IL-15 mutants E64K, N65K, and I68D display properties (low or no biological activity despite high affinity binding to IL-15R α) that designate them as potential IL-15 antagonists. Preliminary experiments² indeed indicate that N65K can inhibit IL-15-induced cell proliferation.

The region of IL-15 that corresponds to peptide 2 seems to participate both in IL-15R α and IL-2R β binding. The functional properties of the B-E29 mAb strengthen this notion. Pepsan studies showed that peptide 2 (⁶⁴ENLI⁶⁸) belongs to the epitopic region of B-E29, and mutagenesis revealed that all amino acids of peptide 2 (Glu-64 to Ile-68) are involved in this process. B-E29 inhibited both IL-15 binding to IL-15R α and IL-15-induced proliferation through the IL-15R α -IL-2R β / γ high affinity complex. However, although it only partially affected binding (about 3-fold reduction in the binding affinity of IL-15), it completely abrogated proliferation. A conclusion from these results is that B-E29, by blocking peptide 2 and especially amino acids Leu-66 and Ile-67, partially affects IL-15 binding to IL-15R α , whereas by blocking amino acids Glu-64, Asn-65, and Ile-68, it completely blocks the recruitment of the IL-2R β chain.

The involvement of the epitope corresponding to peptide 2 in both IL-15R α binding and IL-2R β recruitment might have implications on the dynamics of the receptor assembly. IL-15 would first bind with high affinity to IL-15R α by engaging the peptide 1 and peptide 2 (or part) epitopes. Subsequent IL-2R β recruitment could then involve the engagement of another part of the peptide 2 epitope. Alternatively, a conformational change could occur in which IL-2R β would replace IL-15R α in binding to the peptide 2 epitope.

In the case of mouse IL-2, a sequence of helix B analogous to the epitope in IL-15 corresponding to peptide 1 has been shown to interact with IL-2R α (namely residues Glu-76, Pro-79, Val-83, and Leu-86) (27). In the case of human IL-2, no mutations in the B-helix that affect IL-2 binding to IL-2R α have been described so far, although molecular modeling has predicted a contact between helix B of human IL-2 (namely residues Lys-64 and Glu-68 or Glu-61 and Glu-62) and IL-2R α (52). In contrast, the region in IL-2 within helix C analogous to the epitope in IL-15 corresponding to peptide 2 does not appear to be involved in IL-2R α binding (27). Our results therefore indicate that the mode of interaction of IL-15 with IL-15R α is not completely homologous to the mode of interaction of IL-2 with IL-2R α . This may reflect the fact that IL-15 displays an affinity for its α chain that is about 500-fold higher than the affinity of IL-2 for its α chain. In the case of human IL-2, the loop connecting helix A and helix B (namely residues Lys-35, Arg-38, Phe-42, and Lys-43) has been shown to participate in IL-2R α binding (25). Although our pepsan studies did not show any significant binding of the soluble IL-15R α to peptides that correspond to the A-B loop of IL-15, they remain to be validated by a mutational study.

In conclusion, we identified two regions in IL-15 that are involved in the binding to IL-15R α , one of them being also used to recruit the IL-2R β transducing subunit. IL-15 mutants (L45D, L45E, S51D, and L52D), which display binding and biological properties higher than those of wild-type IL-15 and therefore behave as super-agonists, are valuable tools to expand lymphocyte subsets (*e.g.* NK cells, NK-T cells, and CD8+ memory T cells) and might be useful as therapeutic agents in patients with cancer or immunodeficiencies. Other mutants

(E64K, N65K, and I68D) display properties that designate them as potential IL-15 antagonists and might be useful in inflammatory diseases like rheumatoid arthritis and generalized Shwartzman reaction where IL-15 is thought to play an important role (22).

REFERENCES

- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. R., Watson, J. D., Anderson, D. M., and Giri, J. G. (1994) *Science* **264**, 965-968.
- Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4935-4939.
- Sprang, S. R., and Bazan, J. F. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 815-827.
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindeman, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M. A. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1395-1403.
- Armitage, R. J., Macduff, B. M., Eisenman, J., Paxton, R., and Grabstein, K. H. (1995) *J. Immunol.* **154**, 483-490.
- Wilkinson, P. C., and Liew, F. Y. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 1255-1259.
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K. H., Kumaki, A., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anerson, D. M. (1994) *EMBO J.* **13**, 2822-2830.
- Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Shapiro, D. N., Morris, S. W., Park, L. S., and Cosman, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29862-29869.
- Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B., and Campbell, I. D. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 717-725.
- Minami, Y., Kono, T., Miyasaki, T., and Taniguchi, T. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 245-267.
- Giri, J. G., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H., and Cosman, D. (1995) *J. Leukocyte Biol.* **57**, 763-766.
- Lehours, P., Raher, S., Dubois, S., Guo, J., Godard, A., and Jacques, Y. (2000) *Eur. Cytokine Netw.* **11**, 207-215.
- Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., Gupta, S., Chen, Y. Q., Giri, J. D., and O'Shea, J. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8705-8709.
- Miyasaki, T., Liu, Z.-J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E. L., Perlmutter, R. M., and Taniguchi, T. (1995) *Cell* **81**, 223-231.
- Bulanova, E., Budagian, V., Pohl, T., Krause, H., Durkop, H., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (2001) *J. Immunol.* **167**, 6292-6302.
- Pereno, R., Giron-Michel, J., Gaggero, A., Cazes, E., Meazza, R., Monetti, M., Monaco, E., Mishal, Z., Jasmin, C., Indiveri, F., Ferrini, S., and Azzarone, B. (2000) *Oncogene* **19**, 5153-5162.
- Bulfone-Paus, S. S., Bulanova, E., Pohl, T., Budagian, V., Durkop, H., Ruckert, R., Kunzendorf, U., Paus, R., and Krause, H. (1999) *FASEB J.* **13**, 1575-1585.
- Stevens, A. C., Matthews, J., Andres, P., Baffis, V., Zheng, X. X., Chae, D. W., Smith, J., Strom, T. B., and Maslinski, W. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, G1201-G1208.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., and Peschon, J. J. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 771-780.
- Lodolce, J. P., Burkett, P. R., Boone, D. L., Chien, M., and Ma, A. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 1187-1194.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. (2001) *Nat. Med.* **7**, 114-118.
- Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001) *Blood* **97**, 14-32.
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., and Caligiuri, M. A. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 169-183.
- Collins, L., Tsien, W. H., Seals, C., Hakimi, J., Weber, D., Bailon, P., Hoskings, J., Greene, W. C., Toome, V., and Ju, G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7709-7713.
- Sauve, K., Nachman, M., Spence, C., Bailon, P., Campbell, E., Tsien, W. H., Kondas, J. A., Hakimi, J., and Ju, G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4636-4640.
- Shanafelt, A. B., Lin, Y., Shanafelt, M. C., Forte, C. P., Dubois-Stringfellow, N., Carter, C., Gibbons, J. A., Cheng, S. L., Delaria, K. A., Fleischer, R., Greve, J. M., Gundel, R., Harris, K., Kelly, R., Koh, B., Li, Y., Lantz, L., Mak, P., Neyer, L., Plym, M. J., Roczniak, S., Serban, D., Thrift, J., Tsuchiyama, L., Wetzel, M., Wong, M., and Zolotarev, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**, 1197-1202.
- Zurawski, S. M., Vega, F. J., Doyle, E. L., Huyghe, B., Flaherty, K., McKay, D. B., and Zurawski, G. (1993) *EMBO J.* **12**, 5113-5119.
- Pettit, D. K., Bonnert, T. P., Eisenman, J., Srinivasan, S., Paxton, R., Beers, C., Lynch, D., Miller, B., Yost, J., Grabstein, K. H., and Gombotz, W. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2312-2318.
- Farner, N. L., Gan, J., de Jong, J. L., Leary, T. P., Fenske, T. S., Buckley, P., Dunlap, S., and Sondel, P. M. (1997) *Cytokine* **9**, 316-327.
- Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A., and Jacques, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26978-26984.
- Blanc, C., Vusio, P., Schleinkofer, K., Boisteau, O., Pflanz, S., Minvielle, S., Grotzinger, J., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., Jacques, Y., and Montero-Julian, F. A. (2000) *J. Immunol. Methods* **241**, 43-59.
- Matrisian, L. N., Bowden, G. T., Krieg, P., Fürstenberger, G., Briand, J. P., Leroy, P., and Breathnach, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**,

24322

Human IL-15-binding Site for IL-15R α

- 9413–9417
33. Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11445–11450
 34. Fraker, P. J., and Speck, J. C. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849–857
 35. Slootstra, J. W., Puijk, W. C., Ligtvoet, G. J., Langeveld, J. P., and Meloen, R. H. (1996) *Mol. Divers.* **1**, 87–96
 36. Tejedor, F., and Ballesta, J. P. G. (1982) *Anal. Biochem.* **127**, 143–149
 37. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
 38. Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 543–548
 39. Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815
 40. Luthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992) *Nature* **356**, 83–85
 41. Sippl, M. J. (1993) *Proteins* **17**, 355–362
 42. Laskowski, R. A., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Mol. Biol.* **231**, 1049–1067
 43. Engelman, D. M., and Steitz, T. A. (1981) *Cell* **23**, 411–422
 44. Rozwarski, D. A., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., Bazan, J. F., Bohm, A., Wlodawer, A., Hataada, M., and Karplus, P. A. (1994) *Structure* **2**, 159–173
 45. Bowie, J. U., Luthy, R., and Eisenberg, D. (1991) *Science* **253**, 164–170
 46. Canutescu, A. A., Shelenkov, A. A., and Dunbrack, R. L., Jr. (2003) *Protein Sci.* **12**, 2001–2014
 47. Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olason, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) *J. Comput. Chem.* **4**, 187–217
 48. Maple, J. R., Hwang, M.-J., Jalkanen, K. J., Stocktisch, T. P., and Hagler, A. T. (1998) *J. Comput. Chem.* **19**, 430–458
 49. Greene, W. C., Robb, R. J., Svetlick, P. B., Rusk, C. M., Depper, J. M., and Leonard, W. J. (1985) *J. Exp. Med.* **162**, 363–368
 50. Chang, D. Z., Wu, Z., and Ciardelli, T. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13349–13355
 51. Black, J. (1989) *Science* **139**, 1550–1556
 52. Bamborough, P., Hedgecock, C. J., and Richards, W. G. (1994) *Structure* **2**, 839–851

ANNEXE II

BREVETS :

BREVET I :

IL-15 binding site for IL-15-Ralpha, and specific agonist/antagonists deriving therefrom.

EP 04 290 542.2.

BREVET II :

IL-15Ralpha sushi domain as a selective and potent enhancer of IL-15 action through IL-15Rbeta/gamma, and hyperagonist (IL-15Ralpha sushi - IL-15) fusion proteins.

EP 05 292 210.1.

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for an international application filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.4)

The undersigned applicant(s) (Names should be indicated as they appear in the request):

JACQUES, Yannick
32bis, rue Noire
F-44000 NANTES

BERNARD, Jérôme
2, impasse Pierre Sarre
F-79600 AIRVAULT

PLET, Ariane
88, quai de la Fosse
F-44100 NANTES

HARB, Catherine
13, rue des Granits
F-44100 NANTES

QUEMENER, Agnès
10, rue des Frères Amieux
F-44100 NANTES

MORTIER, Erwan
1, rue du Maréchal de Gassion
F-44100 NANTES

hereby appoints (appoint) the following person as: ☒ agent

☐ common representative

Name and address

(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DESAIX, Anne; VAILLANT Jeanne; RAMEY Daniel; PARIS, Fabienne
Ernest GUTMANN - Yves PLASSERAUD S.A.
3, rue Chauveau-Lagarde; F-75008 PARIS; FRANCE

ALMOND-MARTIN, Carol; SELLIN, Carole
Ernest GUTMANN - Yves PLASSERAUD S.A.
88, boulevard des Belges; F-69452 LYON CEDEX 06; FRANCE

to represent the undersigned before

☒ all the competent International Authorities

☐ the International Searching Authority only

☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with the international application identified below:

Title of the invention: IL-15 binding site for IL15-Ralpha, and specific agonists/antagonists deriving therefrom

Applicant's or agent's file reference: B IL15 muteins PCT - FP/KP

International application number (if already available): PCT/EP2005/002367

filed with the following Office EPO as receiving Office
and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signature of the applicant(s) (where there are several applicants, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading the request or this power):

JACQUES, Yannick

BERNARD, Jérôme

PLET, Ariane

HARB, Catherine

QUEMENER, Agnès

MORTIER, Erwan

Date: _____

RESUME

Mise en Evidence d'une Forme Soluble de la Chaîne Alpha du Récepteur de l'Interleukine-15 Humaine: Caractérisation Structurale et Fonctionnelle.

L'Interleukine-15 (IL-15) est une cytokine qui présente des activités semblables à celles de l'IL-2 *in vitro* du fait de l'utilisation commune des chaînes réceptrices IL-2R β et γ_c , la spécificité d'action étant conférée par une chaîne réceptrice α . L'IL-2R α existe sous forme soluble après clivage protéolytique de la forme membranaire. Dans cette étude, nous avons mis en évidence *in vitro* puis *in vivo* une forme soluble de la chaîne IL-15R α , issue du clivage de l'IL-15R α membranaire et possédant une forte activité antagoniste de l'action de l'IL-15. Le domaine N-terminal de l'IL-15R α (sIL-15R α -sushi) en combinaison avec l'IL-15, s'avère être, quant à lui, agoniste pour les cellules n'exprimant que les chaînes IL-2R β et γ_c , effet renforcé par la liaison IL-15/sIL-15R α grâce à un linker. Ce travail montre que le sIL-15R α est une composante importante dans la régulation des activités de l'IL-15 et pourrait conduire à différentes applications thérapeutiques.

Mots clés : Immunologie, Cytokine, Interleukine-15, Récepteur Soluble de l'Interleukine-15, Activité Antagoniste, Protéine de Fusion, *Transsignalisation*.

ABSTRACT

Molecular and Functionnal Characterisation of a Natural Human Soluble Form of the Interleukin-15 Receptor Alpha Chain.

Interleukin-15 (IL-15) mimics most of the *in vitro* biological activity elicited by IL-2. This redundancy is explained by the common usage of the two receptors IL-2R β and γ_c . Cytokine specificity is conferred by private alpha chains. IL-2R α exists as a soluble form shed from the membrane-bound form. In this study, we identify *in vitro* and then *in vivo* a soluble form of the IL-15R α chain, stemmed from membrane-bound IL-15R α , and which is a strong antagonist of IL-15 activity. The N-terminal domain of IL-15R α (sIL-15R α -sushi), in combination with IL-15 exerts an agonistic effect on IL-2R β / γ_c expressing cells, an effect strenghtened by covalently linking IL-15 to sIL-15R α . This work shows that sIL-15R α plays important roles in regulation of IL-15 activity and could lead to therapeutic applications.

Key Words : Immunology, Cytokine, Interleukin-15, Interleukin-15 Soluble Receptor, Antagonist Activity, Fusion Protein, *Transsignalisation*.

Erwan MORTIER

Département de Recherches en Cancérologie
INSERM U601, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu
44093 Nantes cedex 01